1018

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Patrick DANSETTE
Ingénieur E. S. C. I. L.

Sujet de la Thèse :

Etude sur la Biosynthèse des Naphtoquinones végétales et bactériennes

Soutenue le 12 Octobre 1972, devant la Commission d'Examen

MM. E. LEDERER — Président
S. D. GERO
E. LEISTNER — Examinateurs
R. AZERAD

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Patrick DANSETTE

Ingénieur E. S. C. I. L.

Sujet de la Thèse :

Etude sur la Biosynthèse des Naphtoquinones végétales et bactériennes

Soutenue le Octobre 1972, devant la Commission d'Examen

MM. E. LEDERER Président

S. D. GERO
E. LEISTNER
R. AZERAD
} Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DEDICACE

A MES PARENTS

A CLAUDIA

AVANT - PROPOS

Les recherches qui ont conduit à ce travail ont été effectuées à L'Institut de Biochimie de la Faculté des Sciences d'Orsay.
Nous sommes profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur E. LEDERER, son Directeur, de l'honneur qu'il nous a fait en nous accueillant, en nous indiquant notre voie de recherche, en suivant nos travaux et acceptant de présider le jury de cette thèse.

Que Monsieur S.D. GERO, Maître de Recherches au C.N.R.S. trouve ici nos très sincères remerciements. En acceptant de juger ce travail, il nous fait un grand honneur et nous apporte une caution très appréciée.

Il nous est particulièrement agréable de remercier Monsieur le Professeur E. LEISTNER, avec l'équipe de qui nous avons été constamment en amicale concurrence, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire bénéficier de sa très haute compétence.

Nous tenons aussi à exprimer notre très vive reconnaissance à Monsieur Robert AZERAD. Avant d'être membre de notre jury, il a dirigé efficacement notre travail avec un intérêt constant. Nous sommes très heureux d'être son disciple et très fier de la confiance et de l'amitié qu'il n'a cessé de nous témoigner. Nous croyons que son exemple a contribué essentiellement à notre formation scientifique. Qu'il trouve ici le remerciement public que nous lui devons et que nous dicte notre amitié.

Nous remercions notre parrain au C.N.R.S., Monsieur le Professeur CHAPPEVILLE, de la constante bienveillance avec laquelle il a suivi nos travaux.

.../...

AVANT - PROPOS

Que Monsieur le Professeur P. BOULANGER trouve ici l'expression de notre amicale et respectueuse gratitude ; nous lui devons l'orientation de nos études.

Mireille LEDUC, Martine GUERIN et Alexandre YAPO sont, parmi nos camarades de laboratoires, ceux qui ont été le plus mêlés à nos travaux. Qu'ils soient remerciés de leur coopération et de leur constante gentillesse, mais nous ne pouvons oublier tous les autres dont la cordialité efficace nous a beaucoup aidé.

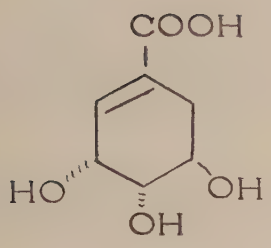
Enfin, nous sommes heureux de remercier Madame B. KIPP pour son excellent travail de dactylographie et de mise en page.

Le travail de cette thèse a été effectué grâce à un contrat de chercheur du C.N.R.S. que nous remercions très vivement.

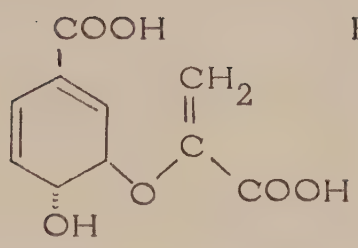
LISTE DES ABREVIATIONS

Act. spéc.	activité spécifique
% incorp.	pourcentage d'incorporation
DHS	déhydroshikimate
CA	acide chorismique
SA	acide shikimique
Q-8	ubiquinone-8
MK-9	ménaquinone-9
DMK-8	desméthylménaquinone-8
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
POB	parahydroxybenzoate
PAB	para aminobenzoate
DOB	dihydroxy-2,3 benzoate
OSB	ortho succinylbenzoate
DiOH benzaldéhyde	dihydroxy-3,4 benzaldéhyde
pOH benzaldéhyde	parahydroxybenzaldéhyde.

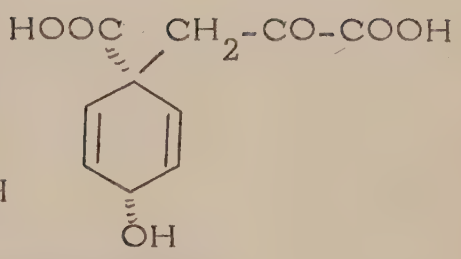
.../...



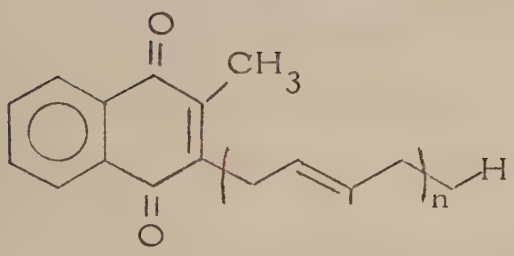
Ac. shikimique



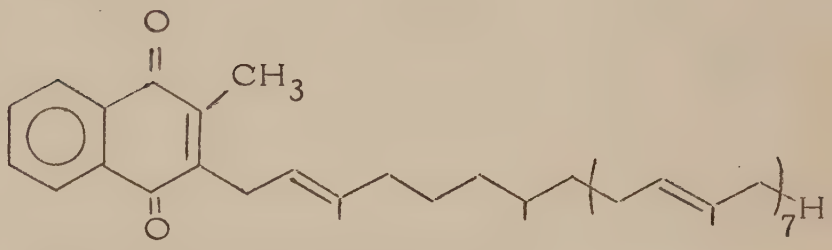
Ac. chorismique



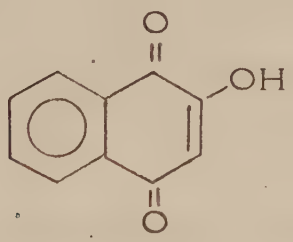
Ac. préphénique



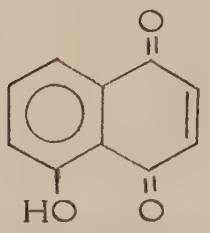
Ménaquinone MKn



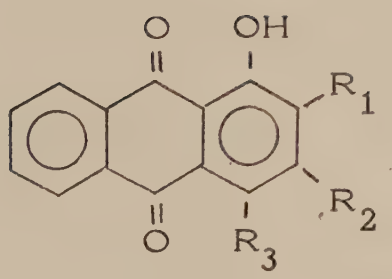
Dihydroménaquinone MK-9 (II) H_2



Lawsone



Juglone



	R_1	R_2	R_3
Alizarine	OH	H	H
Pseudopurpurine	COOH	OH	OH
Purpurine	OH	H	OH
Xanthopurpurine	H	OH	H
Lucidine	CH_2OH	OH	H

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ..... p. 1

CHAPITRE I

Synthèse radiochimique de précurseurs éventuels des naphto et ménaquinones ..... p. 4

- Aldéhydes et acides aromatiques ..... p. 5
- Acide shikimique ^{3}H ..... p. 7
- Stéréospécificité de la DHS-réductase ..... p. 9
- Acide chorismique ^{3}H ..... p. 10
- O S B ..... p. 10
- Dérivés de l'O S B ..... p. 15

CHAPITRE II

Isolement et dégradations des ménaquinones bactériennes et des quinones végétales ..... p. 19

- Isolement des quinones ..... p. 19
- Dégradation de la lawsone ..... p. 20
- Dégradation de la ménaquinone ..... p. 22
- Dégradation de la juglone ..... p. 28
- Dégradation des anthraquinones ..... p. 29

CHAPITRE III

Incorporation de précurseurs radioactifs dans les ménaquinones bactériennes ..... p. 30

A - Essais préliminaires ..... p. 30
B - Incorporation d'acide shikimique ^{3}H-3 ..... p. 31
C - L'acide chorismique, intermédiaire probable dans la biosynthèse des ménaquinones ..... p. 34
D - Participation du groupement énoylpyruvique de l'acide chorismique à la synthèse du noyau naphtoquinonique .. p. 35
E - Participation du glutamate ; l'acide o-succinoylbenzoïque p. 41
F - Dilution de l'incorporation du glutamate et du shikimate p. 49
G - Orientation de l'OSB lors de son incorporation dans les ménaquinones ..... p. 51

.../...

CHAPITRE IV

Incorporation de précurseurs radioactifs dans les naphtoquinones végétales ..... p. 57

A - Incorporation d'acide shikimique ^{3}H-3 ..... p. 57
B - L'acide chorismique précurseur des naphtoquinones végétales ..... p. 61
C - Participation du groupement énoylpyruvique à la biosynthèse du noyau ..... p. 65
D - Incorporation de l'OSB dans les naphtoquinones végétales ..... p. 66
E - Dilution par l'OSB de l'incorporation du glutamate et du shikimate ..... p. 67
F - Essais d'incorporation de glutamate et d'OSB tritiés p. 69
G - Orientation de l'OSB lors de son incorporation dans les quinones végétales ..... p. 75
H - Précurseurs naphtoquinoniques de la lawsone ..... p. 81

CHAPITRE V

Incorporation de précurseurs radioactifs dans les anthraquinones végétales ..... p. 84

- Orientation de l'OSB lors de so incorporation dans les anthraquinones de Rubia ..... p. 86

CHAPITRE VI

Discussion ..... p. 91

PARTIE EXPERIMENTALE

- Chromatographie ..... p. 111
- Préparation d'aldéhydes et d'acides aromatiques hydroxylés ou aminés ..... p. 111
- Préparation de l'acide D-shikimique ^{3}H-3 et de l'acide chorismique ^{3}H-5 ..... p. 116
- Préparation d'acides benzoïques ortho-alcoylés ou ortho-acylés ..... p. 123
- Administration des molécules radioactives ..... p. 133
- Isolement des substances naturelles ..... p. 135
- Dégradation des quinones ..... p. 140
- Hydrolyse alcaline des protéines végétales ou bactériennes et isolement des acides aminés ..... p. 143

.../...

- Dégradation asymétrique de la lawsone..... p. 145
- Dégradation asymétrique des ménaquinones ..... p. 148
- Dégradation asymétrique des diméthoxy-anthraquinones p. 150
- Echange de protons des quinones et hydroquinones en milieu aqueux ..... p. 151

NOTE TECHNIQUE..... p. 154

BIBLIOGRAPHIE..... p. 156

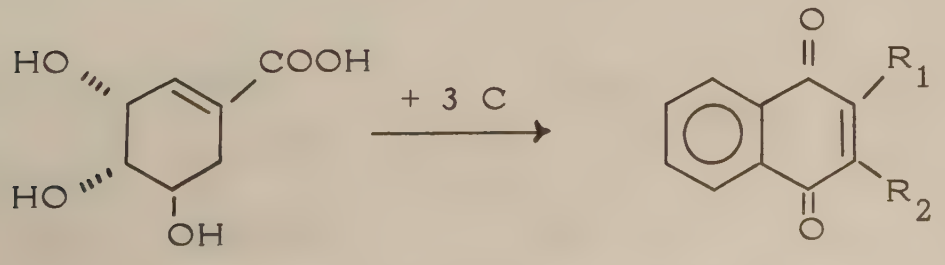
INTRODUCTION

Les quinones sont des composés largement répandus dans la nature, aussi bien dans le règne végétal, qu'animal ou microbien. Ces molécules sont biosynthétisées à partir d'un petit nombre d'intermédiaires simples. Le noyau des naphtoquinones, en particulier, peut être synthétisé à partir de quatre précurseurs principaux : l'acétate, la toluhydroquinone, le p-hydroxybenzoate et le shikimate. (100).

L'objet du présent travail est l'étude de la biosynthèse des naphtoquinones végétales ou bactériennes dérivant de l'acide shikimique (acide trihydroxy-3,4,5 cyclohexène-1 carboxylique), et la recherche des intermédiaires de cette voie de biosynthèse. Etant donné, à l'origine, l'absence quasi-totale de résultats expérimentaux dans ce domaine et le développement important qu'il a acquis en même temps que nous commencions notre travail, celui-ci a été constamment lié dans son développement aux données les plus récentes parues dans la littérature.

Quelques études antérieures avaient montré que l'acide shikimique devait être le précurseur commun des acides aminés aromatiques et de plusieurs facteurs de croissance aromatiques (acide dihydroxy-2,3 benzoïque, dihydroxy-3,4 benzoïque, p-aminobenzoïque et p-hydroxybenzoïque) ainsi que de la ménaquinone de Escherichia coli (16,17).

Lorsque nous commençons ce travail, on sait seulement que l'acide shikimique est incorporé in toto dans les ménaquinones bactériennes, de telle sorte que son carboxyle devient un des carbonyles de la quinone (12,47).

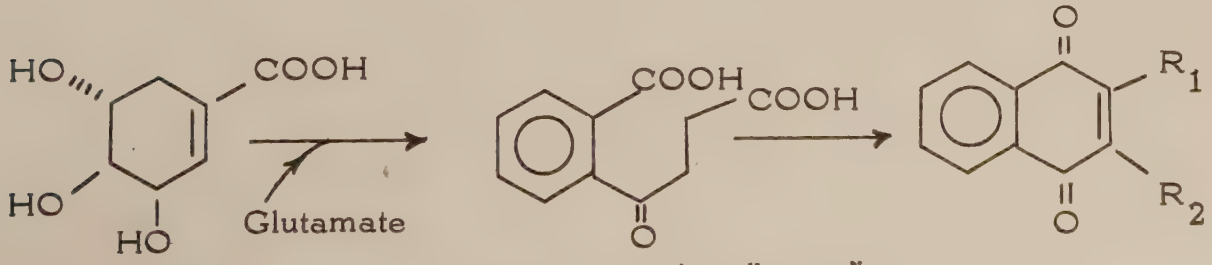


Trois questions se posent alors :

- Sur lequel des carbones 2 ou 6 adjacents au carboxyle, le cycle naphtoquinonique se ferme-t-il ?
- Quelle est la molécule qui fournit les trois carbones nécessaires à la fermeture du cycle quinonique de la naphtoquinone, et quel est le mécanisme de cette fermeture ?
- Le cycle naphtoquinonique ainsi formé est-il incorporé de façon symétrique ou non dans les ménaquinones, c'est-à-dire le carboxyle de l'acide shikimique est-il incorporé indifféremment dans les deux carbonyles quinoniques, ou sélectivement dans l'un des deux ?

Pour résoudre la première question, LEISTNER et ZENK d'une part (65), et M. LEDUC (59) dans notre laboratoire d'autre part, ont utilisé l'acide shikimique ^{14}C-1,6. Cette méthode nécessite une dégradation laborieuse des quinones formées. Nous avons, quant à nous, synthétisé un acide shikimique ^{3}H-3 marqué au tritium en une position spécifique, ce qui permet une dégradation simple et univoque.

Une réponse partielle à la deuxième question a été donnée par CAMPBELL (11). Il montrait, en 1969, que le glutamate est capable d'apporter ses carbones 2, 3 et 4 pour la fermeture du cycle naphtoquinonique, mais il ne disposait pas alors des résultats de notre laboratoire lui permettant d'induire correctement le mécanisme de cette biosynthèse. Nous avons pu postuler la formation d'un intermédiaire, l'acide ortho-succinoylbenzoïque - OBS - (21), dont nous avons pu prouver l'existence par synthèse et incorporation dans les quinones étudiées.



Acide o-succinoylbenzoïque

OSB

.../...

L'existence de cet intermédiaire et la possibilité que nous avons eue de réaliser sur l'OSB différents marquages spécifiques nous ont permis de répondre à la troisième question, à savoir, l'incorporation orientée ou non de l'OSB dans les quinones.

En même temps, différentes équipes montraient que d'autres quinones existant dans les végétaux telles que la lawsone, la juglone et différentes anthraquinones dérivaient aussi de l'acide shikimique ; il nous a semblé intéressant d'appliquer nos techniques à l'étude très voisine de la biosynthèse de ces quinones.

Pour la clarté de l'exposé, nous présentons dans le premier chapître les méthodes de synthèse des précurseurs radioactifs, dans le deuxième, les méthodes d'isolement et de dégradation des quinones.
Les trois chapîtres suivants rapportent l'incorporation dans les ménaquinones, les naphtoquinones végétales et les anthraquinones végétales.
Dans le sixième chapître, nous discutons nos résultats et proposons un schéma général de biosynthèse des quinones dérivant de l'acide shikimique.

La partie expérimentale de ce travail est rassemblée après l'exposé théorique.

CHAPITRE I

SYNTHESE RADIOCHIMIQUE DE PRECURSEURS EVENTUELS DES NAPHTO ET MENAQUINONES

La caractérisation d'intermédiaires biosynthétiques et la description complète d'un schéma de biosynthèse ont été généralement réalisées à l'aide de deux méthodes distinctes :

- la première utilise des mutants bactériens capables d'accumuler des produits intermédiaires, ou d'incorporer ceux-ci ;
- la deuxième s'intéresse à l'incorporation de traceurs radioactifs et à leur devenir dans les organismes étudiés.

C'est cette deuxième méthode que nous avons principalement utilisée. Or, si certaines des molécules marquées susceptibles de servir de précurseurs pour la biosynthèse des naphto et ménaquinones étaient disponibles commercialement, la plupart d'entre elles ont dû être synthétisées chimiquement ou enzymatiquement par nos soins.

Le souci principal qui nous a guidé dans le choix des réactions chimiques de synthèse a été le plus souvent, non la recherche du rendement maximum, mais plutôt la simplicité des manipulations à effectuer (en raison des quantités très faibles de réactifs mises en jeu) et surtout le plus petit nombre possible d'étapes entre l'introduction de l'isotope et l'obtention du produit final. D'autre part, le choix limité de molécules isotopiques et leur coût ont naturellement influencé les voies de synthèse choisies. Ainsi, la synthèse de molécules radioactives à partir de substances gazeuses nécessitant un appareillage assez complexe que nous ne possédions pas a été évitée.

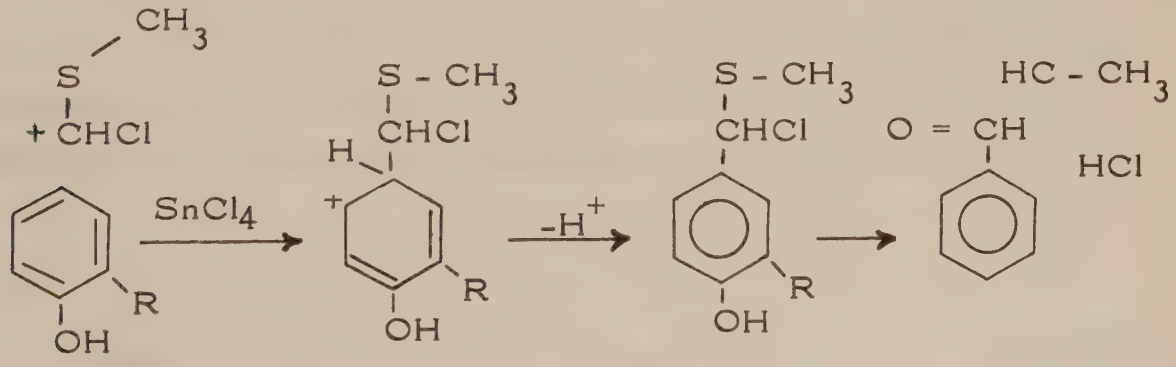
.../...

Il nous faut insister sur le fait que l'utilisation de molécules marquées dans l'étude des voies de biosynthèse a conduit dans le passé à certains déboires. En effet, s'il existe dans le précurseur étudié une impureté radioactive, et que seule l'impureté soit incorporée, le résultat de l'expérience est complètement faussé. C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des méthodes de purification très soignées, conduisant à une pureté radiochimique suffisante. A défaut, il faut être capable d'identifier complètement les impuretés radioactives. La chromatographie en couche mince préparative nous a généralement permis les purifications nécessaires, le contrôle des produits obtenus se faisant par radio-chromatographie analytique, sur couche mince de Silicagel ou de cellulose (cf note technique) et sur papier.(83).

Nous décrirons ci-dessous la synthèse de chaque produit :

p-hydroxybenzaldéhyde ^{14}C

Pour la préparation du p-hydroxybenzaldéhyde ^{14}C et du dihydroxy-3,4 benzaldéhyde ^{3}H, nous avons utilisé la réaction décrite par GROSS et MATHEY (43), c'est-à-dire la condensation du dichlorométhylméthylsulfure (5) sur un noyau phénolique en présence de chlorure stannique (48) suivie d'hydrolyse.



Le p-hydroxybenzaldéhyde ^{14}C-1,2,3,4,5,6 a été obtenu avec un rendement de 17 à 23 % (20) à partir du phénol ^{14}C-U, purifié par entraînement à la vapeur et sublimation.

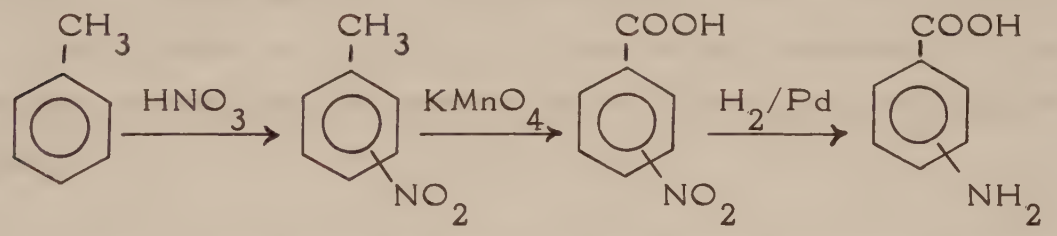
.../...

Dihydroxybenzaldéhyde ^{3}H

Le dihydroxy-3,4 benzaldéhyde ^{3}H-1,5,6 a été obtenu avec un rendement de 14 % (20) à partir du catéchol ^{3}H-G et purifié par chromatographie sur couche mince de Silicagel G.

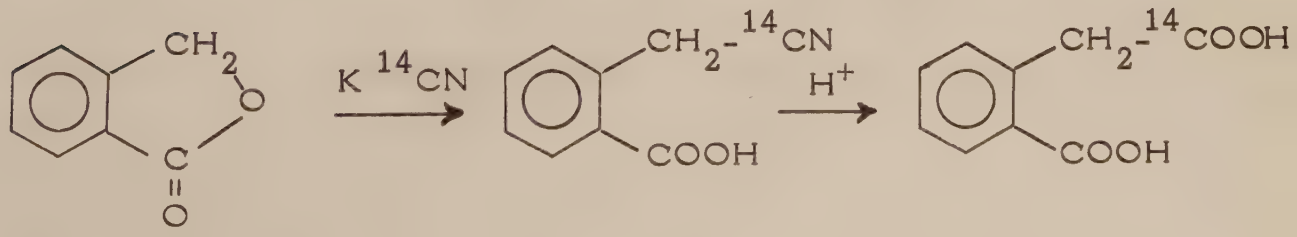
Acides aminobenzoïques ^{14}C

Les acides p-aminobenzoïque ^{14}C-2,3,4,5 et anthranilique ^{14}C-2,3,4,5 ont été obtenus en trois étapes à partir du toluène ^{14}C-2,3,4,5 par nitration en nitrotoluène (56), oxydation permanganique en acides nitrobenzoïques (3), séparation sur papier des deux isomères (57) et hydrogénation catalytique (palladium 10 % sur charbon). Les rendements respectifs finaux sont de 49 et 28 % (20).



Acide homophtalique ^{14}C

L'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique ^{14}C-1 a été synthétisé avec un rendement de 15 % (47) à partir du cyanure ^{14}C de potassium par condensation sur le phtalide, suivie d'hydrolyse du nitrile en milieu sulfurique et purification par chromatographie sur Silicagel G.



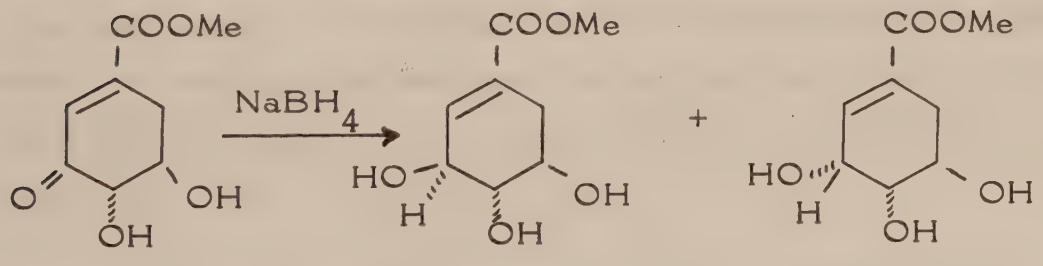
.../...

Acide shikimique ^{3}H

L'acide shikimique ^{3}H-3 a été obtenu par réduction du déhydro-3 shikimate de méthyle par le borohydrure de sodium tritié. (42).

Au début de notre travail, nous avons préparé le déhydroshikimate de méthyle par oxydation par l'oxygène sur platine de l'acide D-shikimique suivie de méthylation (51,52,47). La réduction par le borohydrure tritié fournissait un mélange de deux épimères qui avaient été purifiés ensemble mais non séparés. La purification décrite du déhydroshikimate s'étant révélée très laborieuse, nous lui avons substitué une autre méthode, basée sur l'isolement du produit naturel excrété dans le milieu de culture du mutant 83-2 de Escherichia coli (84). La technique d'isolement a été simplifiée et les rendements améliorés en méthylant par le diazométhane à -40° C le produit brut élué d'une colonne de Norit et en cristallisant directement l'ester méthylique du déhydroshikimate (environ 100-200 mg par litre de culture).

Par ailleurs, il s'agissait de séparer les deux épimères formés au cours de la réduction par le borohydrure de sodium ; les hydroxyles vicinaux de l'épi-3 shikimate de méthyle sont trans-trans, tandis que ceux du shikimate sont cis-trans.



épishikimate de méthyle

shikimate de méthyle

.../...

D'autre part, seul le shikimate est capable de former un cétal cyclique. C'est pourquoi nous avons pensé que seul aussi il pourrait former avec le borate un complexe, porteur d'une charge nette négative, ce qui permettrait une séparation par électrophorèse (96). Cette hypothèse s'est révélée exacte et nous avons obtenu une excellente séparation des deux épimères par électrophorèse sur papier en tampon borate de sodium (0,2 M acide borique, pH 9). Seul le shikimate de méthyle migre, l'épishikimate et le déhydroshikimate ne migrent pas.

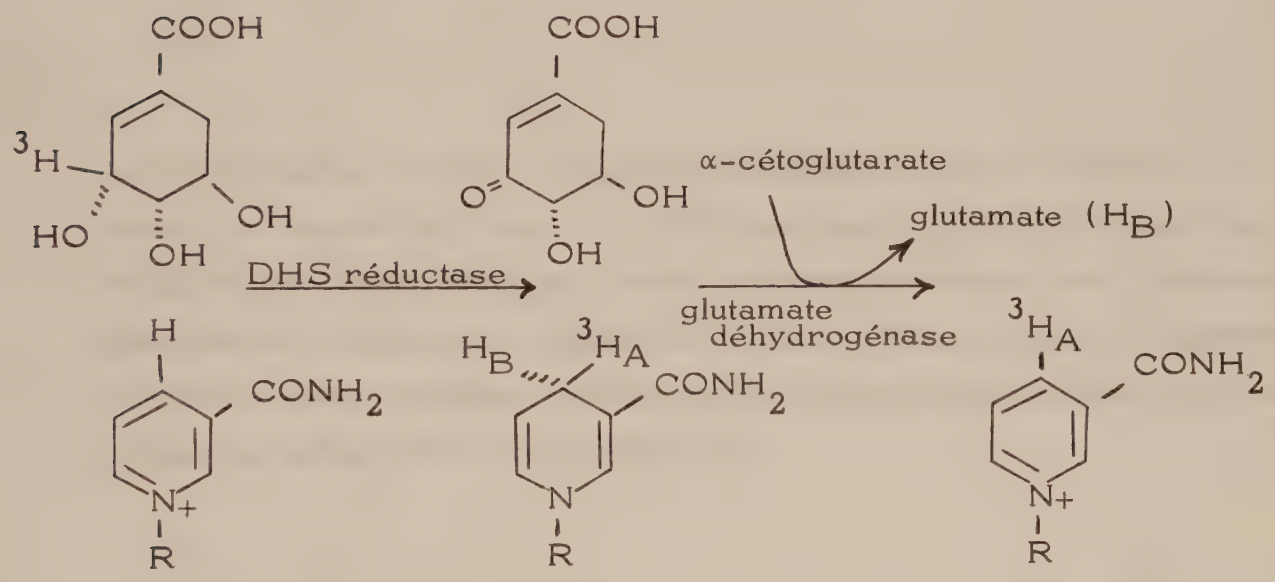
Le rendement en épishikimate étant supérieur à celui du shikimate, et cette méthode d'électrophorèse nous permettant de déterminer les proportions exactes de chaque épimère, nous avons recherché les conditions optimales de la réaction et étudié l'influence du solvant et de la température sur les quantités respectives d'épishikimate et de shikimate. La quantité de shikimate formé est toujours inférieure à celle de l'épishikimate et semble diminuer en présence de butylamine (solvant du borohydrure tritié du commerce), et augmenter quand la température diminue. Il faut noter qu'à température plus élevée (20-25° C), il se forme un produit secondaire migrant comme le shikimate de méthyle, difficile à hydrolyser mais que l'on peut séparer ensuite de l'acide shikimique par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.

Nous avons donc choisi d'éliminer la butylamine et de travailler à O° C dans le méthanol. Par ailleurs, comme le déhydroshikimate est très bien séparé du shikimate par l'électrophorèse, nous utilisons un excès de déhydroshikimate par rapport au borohydrure tritié. Dans les conditions adoptées, le rapport épishikimate / shikimate est d'environ 2 / 1.

Le shikimate de méthyle est élué du papier d'électrophorèse par le méthanol, hydrolysé par la soude méthanolique 0,3 N à 37° C pendant une nuit, et l'acide est purifié par chromatographie sur Amberlite IRA 400 (100-200 Mesh forme acétate) ; le rendement final en radioactivité est de 10 % par rapport au borohydrure.

.../...

Incidemment, nous avons utilisé l'acide shikimique ^{3}H-3 ainsi préparé pour confirmer un mécanisme enzymatique précédemment démontré dans le laboratoire (22), ce qui en passant assurait l'identité de notre acide shikimique avec le produit naturel. On avait en effet montré que la déhydroshikimate réductase de E. coli transférait le proton H_A-(pro R) du NADPH marqué au tritium sur le déhydroshikimate. Nous avons réalisé la réaction inverse en oxydant l'acide shikimique ^{3}H-3 par la déhydroshikimate réductase en présence de NADP. Après établissement de l'équilibre, destruction de l'enzyme et réoxydation du NADPH formé par la glutamate déhydrogénase en présence d'α-cétoglutarate (déhydrogénase de type B), le NADP récupéré après chromatographie est marqué et contient la même activité spécifique que le shikimate ^{3}H-3. (*)



On peut souligner l'intérêt de cet enzyme de E. coli, facile à purifier, qui permet pour la première fois une synthèse rapide de NADPH marqué au tritium en H_A. Cette propriété a été depuis utilisée au laboratoire dans l'étude de la réduction enzymatique des doubles-liaisons phospholipidiques (29).

Il a été montré depuis que la DHS réductase de Pisum sativum a la même stéréospécificité (23).

.../...

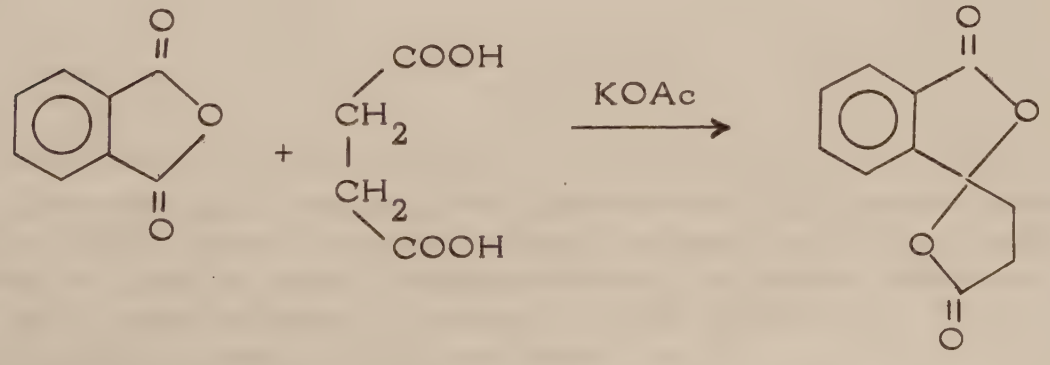
(*) En tenant compte d'un effet isotopique $\frac{K_H}{K_{3H}} \# 2$ (22).

Acide chorismique ^3H

L'acide chorismique ^3H-5 a été synthétisé enzymatiquement à partir de shikimate ^3H-3 à l'aide d'un extrait dialysé du mutant 62-1 de Aerobacter aerogenes, avec un rendement de 40 à 50 % par rapport au shikimate, le Ribose-5 phosphate servant comme source de phosphoénolpyruvate et de NADH (39). Le chorismate obtenu est purifié par chromatographie sur Dowex 1-X-4 (forme Cl^-, 200-400 Mesh) ou par électrophorèse sur papier en tampon tris-HCl (pH 8,2).
La pureté est contrôlée par chromatographie sur couche mince de cellulose et l'activité spécifique mesurée après transformation en acide anthranilique par un extrait de A. aerogenes 170-44 en présence de glutamine. Le chorismate ^3H-5 est conservé en solution à pH 8 - 8,5 à -20° C afin de minimiser sa décomposition. (98).

O S B

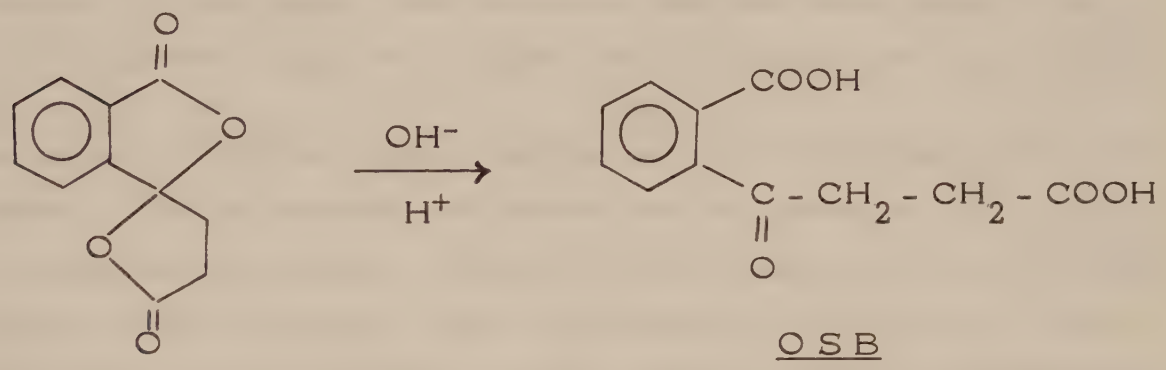
La dilactone de l'acide o-succinoylbenzoïque [acide (carboxy-2' phényl)-4 oxo-4 butyrique] (OSB dilactone) a été synthétisée par ROSER en 1884 (80), par action d'acide succinique sur l'anhydride phtalique en présence d'acétate de sodium. Nous avons pu augmenter la vitesse de la réaction en utilisant de l'acétate de potassium et en réglant la température à 217-220° C.



OSB dilactone

Une étude cinétique effectuée à cette température montre que le rendement maximum de l'ordre de 17 - 20 % en OSB dilactone, est atteint en présence de 10 % d'acétate de potassium en 20 - 25 minutes. Les points de fusion (F = 120° C), analyse, spectres RMN et IR sont en accord avec la structure proposée.

Après hydrolyse par la soude, on obtient facilement en solution le sel de sodium de l'acide. Après acidification, l'acide est extractible dans l'acétate d'éthyle et peut être cristallisé (F = 137° C). Il reforme facilement la lactone par chauffage ou sur plaque de Silicagel G. Les spectres RMN et IR sont en accord avec la structure délactonisée.



OSB

C'est également la méthode de ROSER que nous avons utilisée pour synthétiser l'acide o-succinoylbenzoïque marqué soit au ^{14}C, soit au tritium de manière symétrique (*).

.../...

(*) Pour la commodité de l'exposé, nous appellerons OSB symétriquement marqué un OSB marqué dans des atomes devenant équivalents après l'incorporation dans le noyau naphtoquinonique, en faisant référence à la symétrie de la naphtoquinone. Exemple : OSB ^{14}COOH-2',^{14}CO-4 marque la naphtoquinone sur ses carbones 1 et 4.

Nous appellerons OSB dissymétriquement marqué un OSB marqué sur un ou plusieurs atomes, susceptible de marquer le noyau naphtoquinonique d'une manière non symétrique.

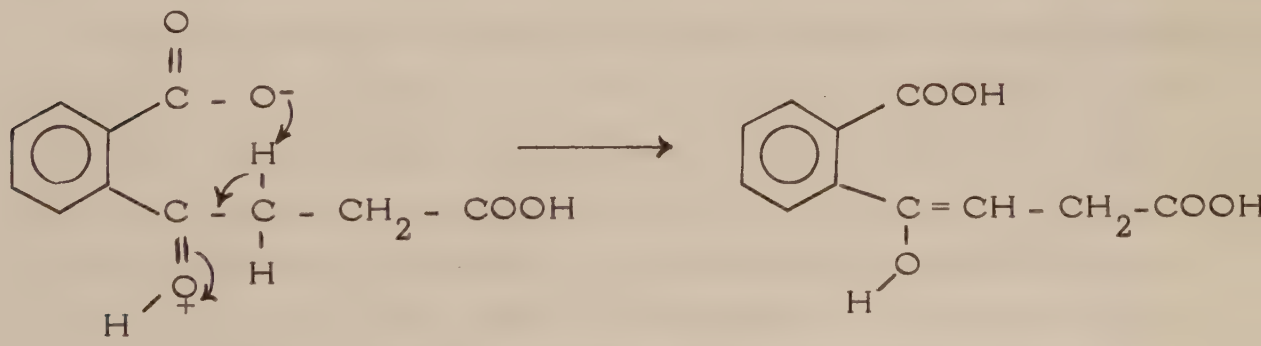
OSB ^{14}C-2',4

A partir de l'anhydride phtalique ^{14}CO , on obtient de l'OSB ^{14}C-2',4 avec un rendement de 17 % en radioactivité.

OSB ^{3}H-2

A partir de l'acide succinique ^{3}H-2,3 on obtient la dilactone ^{3}H-2,3 dont l'activité spécifique n'est que 2/3 de celle de l'acide succinique de départ. Cette perte de radioactivité est probablement due à l'équilibration totale, au cours de la réaction, des quatre protons énolisables de l'acide succinique ou d'un intermédiaire réactionnel, avec les protons carboxyliques, ultérieurement éliminés sous forme d'eau. (4 H conservés dans la dilactone pour 6 dans l'acide succinique).

Lors de l'hydrolyse de la dilactone en acide, en milieu alcalin, la moitié de la radioactivité est perdue par énolisation du CH_2-3 en α du groupement cétonique, ce qui confirme l'équipartition de la radioactivité dans la dilactone entre les protons en C-2 et C-3. Cette énolisation en milieu alcalin est très rapide, comme le montrent les cinétiques d'échange d'eau tritiée avec la dilactone (voir partie expérimentale) ; elle est certainement assistée par la présence du carboxyle en 2' (50). Il en résulte que l'acide OSB



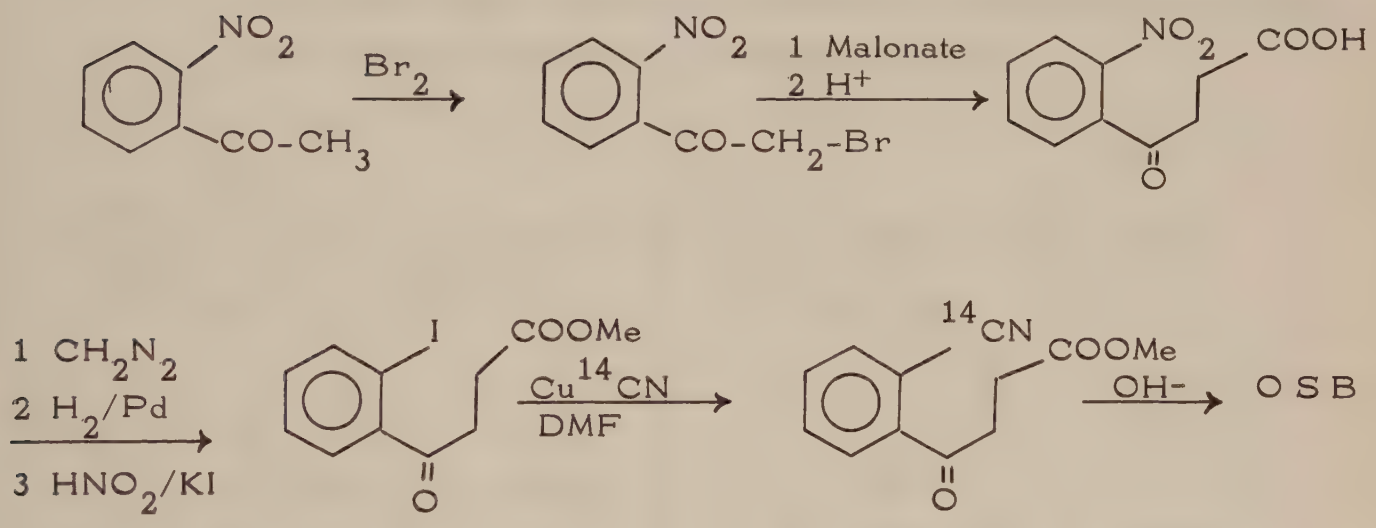
ainsi obtenu n'est marqué au tritium que sur le CH_2 - 2 : OSB ^{3}H-2.

O S B ^{14}C dissymétriques

En vue de tester l'incorporation symétrique ou non de l'acide shikimique ou de l'OSB dans les quinones naturelles, il était intéressant de synthétiser ce dernier marqué de manière dissymétrique (cf note p. 11). Dans ce but, nous avons développé deux synthèses différentes :

1°) O S B ^{14}COOH-2'

Cette synthèse originale utilise l'action du cyanure de cuivre ^{14}C sur l'iodobenzoylpropionate de méthyle préparé selon le schéma suivant :



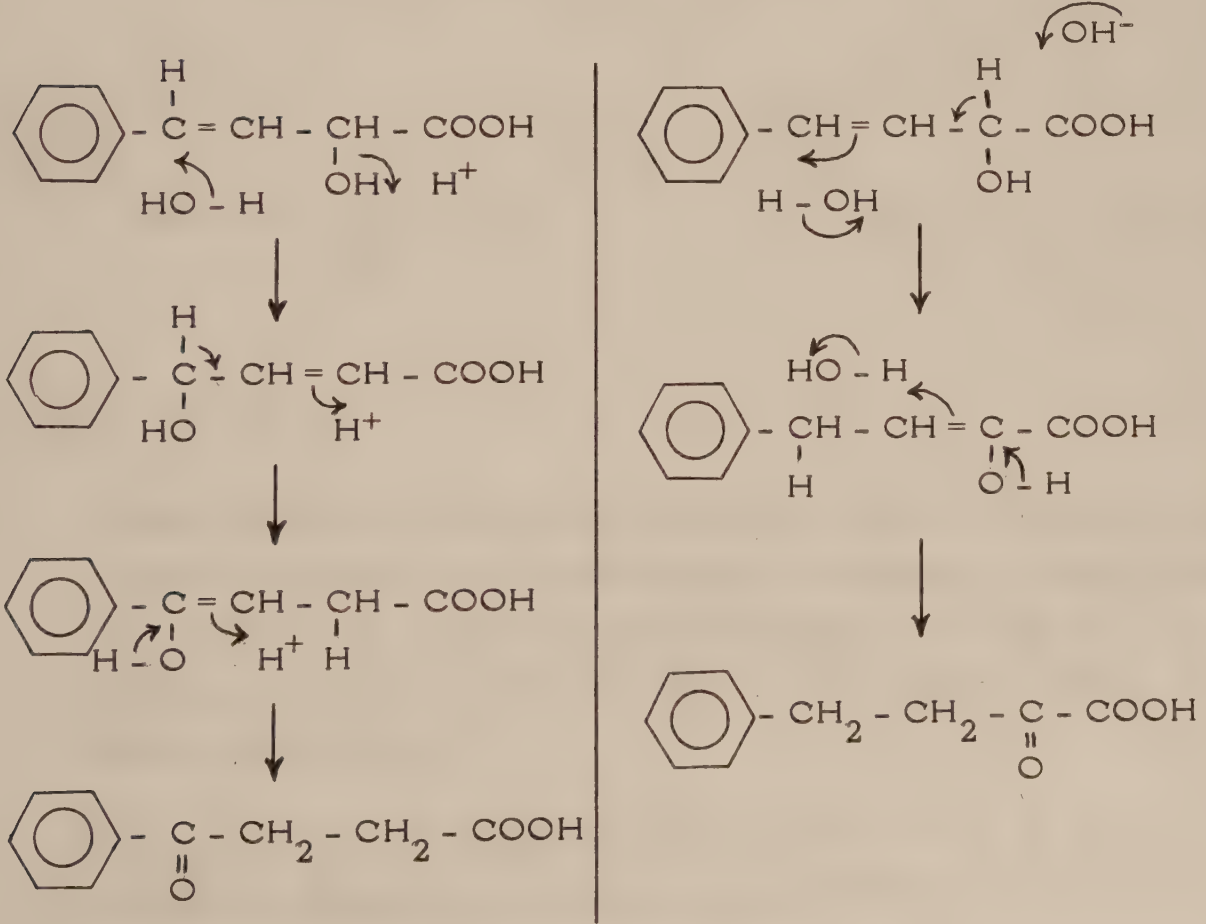
L'acide o-nitrobenzoylpropionique a été synthétisé d'après SENOH (89) avec un rendement de 22 %, par action du malonate sur la bromonitroacétophénone suivie d'une hydrolyse acide. La méthylation et l'hydrogénation catalytique de cet acide fournissent l'o-aminobenzoylpropionate de méthyle. La réaction du cyanure de cuivre sur ce composé (95) conduit à des goudrons et seulement 10 à 15 % du nitrile cherché. C'est pourquoi nous avons préféré préparer l'iodobenzoylpropionate de méthyle, à partir de l'acide nitré avec un rendement de 60 % (95). La réaction du dérivé iodé avec le cyanure de cuivre ^{14}C dans le diméthylformamide (49)

.../...

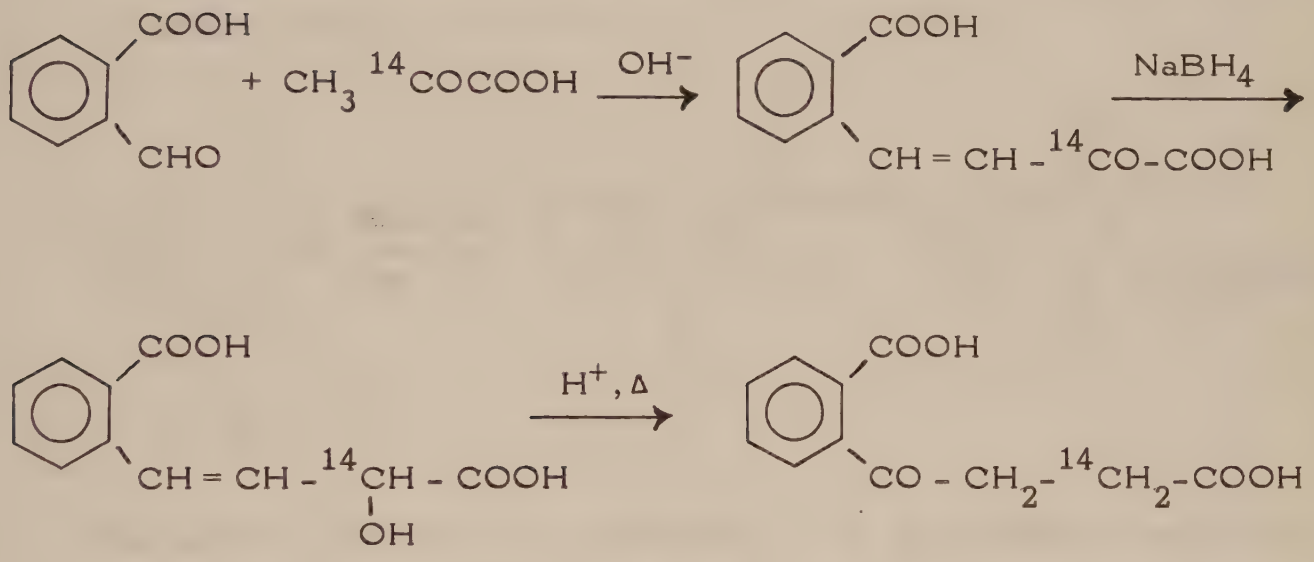
à reflux donne le nitrile avec un rendement de 55 % (par rapport à $K^{14}CN$). Le nitrile est hydrolysé aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide ; le rendement est cependant meilleur en milieu alcalin à 37° C (environ 50 % acide + 20 % de lactone). Le rendement final en acide par rapport à $K^{14}CN$ est de 27 %.

2°) O S B $^{14}CH_2$-2

La méthode employée s'inspire des travaux de FITTIG (35) sur la synthèse de l'acide benzoylpropionique par isomérisation acide de l'acide benzylidène lactique. L'isomérisation alcaline, par contre, conduit à l'acide benzylpyruvique. Le mécanisme de cette réaction n'a pas été étudié sérieusement depuis 1916, cependant sur la base des travaux de CORDIER et BOUGAULT (15,8), nous pouvons proposer le mécanisme suivant :



L'o-carboxybenzaldéhyde peut être condensée de la même manière que la benzaldéhyde avec le pyruvate ^{14}C-2 en milieu alcalin (pH 9) ; l'o-carboxybenzylidène pyruvate ^{14}C ainsi formé est directement réduit par le borohydrure de sodium et l'acide o-carboxybenzylidène lactique résultant est extrait puis isomérisé à reflux dans l'acide chlorhydrique. Le rendement global en acide o-succinoylbenzoïque $^{14}CH_2$-2 est de 20 % par rapport au pyruvate.



Dérivés de l'O S B

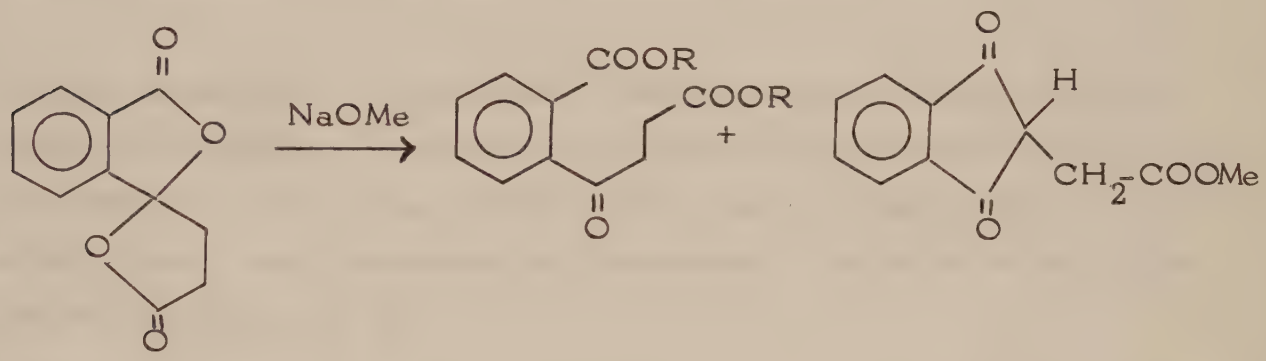
L'acide OSB a pu être réduit aisément en acide (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy-4 butyrique par le borohydrure de sodium ; l'acide obtenu (F = 107° C) se transforme en monolactone (F = 120-121° C) par chauffage. La même lactone est obtenue par réduction directe de l'OSB dilactone par $NaBH_4$.

Nous avons ainsi pu obtenir à partir d'OSB ^{14}C-2',4 de l'acide (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy-4 butyrique ^{14}C-2',4 qui a été purifié par chromatographie sur cellulose.

.../...

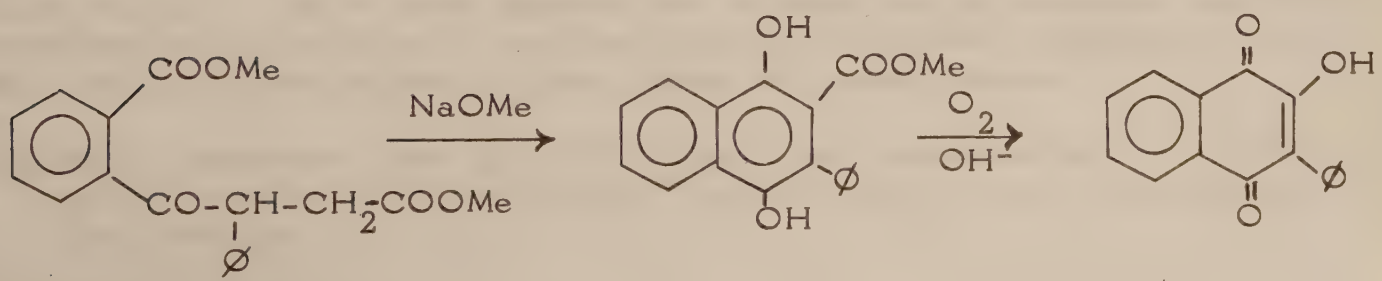
Comme il sera montré par la suite (chapîtres III et IV), l'OSB constitue un excellent précurseur du noyau naphtoquinonique chez les plantes et les bactéries. Il était intéressant d'envisager, du point de vue purement chimique, un mécanisme simple de fermeture du noyau quinonique. L'hypothèse la plus évidente était une réaction de CLAISEN sur le CH_2-2 suivie ou accompagnée de décarboxylation.

Le traitement de l'OSB dilactone par deux équivalents de méthylate de sodium ne donne aucun dérivé naphtalénique identifiable, mais un mélange de mono et diméthyl esters de l'OSB et d'indanedione acétate de méthyle (30).



Ceci semble indiquer que le méthylène en -3 de l'OSB est beaucoup plus activé que le méthylène en -2. Ce qui est d'ailleurs à rapprocher des résultats précédemment rapportés sur l'énolisation très facile de ce groupement.

Par contre, RADULESCU a pu cycliser dans les mêmes conditions l'ester méthylique du phényl-3 OSB en dihydroxy-1,4 phényl-3 naphtoate de méthyle qui, hydrolysé en présence d'air, s'oxyde en phényl-3 lawsone (76).



.../...

La présence du groupement phényle diminue la réactivité du CH_2 en 3 dans la réaction de cyclisation, probablement par stabilisation de la forme énolique en 4.

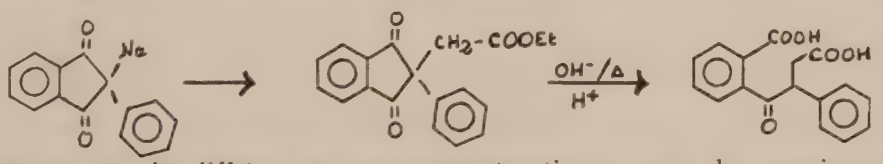
Acide dihydroxy-1,4 naphtoïque

L'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque est un intermédiaire possible entre l'OSB et le noyau naphtoquinonique. Nous avons donc préparé cette molécule selon HOWMEYER (55), par hydrolyse et décarboxylation du dihydro-1,4 naphtalate d'éthyle, lui-même préparé par condensation du succinate d'éthyle sur le phtalate d'éthyle.

L'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque est un composé instable, particulièrement sensible à l'oxydation, la quinone résultant étant inconnue ; en solution à pH 7, il se colore assez vite en rouge sombre, et en milieu alcalin cette coloration est instantanée ; en milieu acide, il se dimérise rapidement (82).

.../...

Le phényl OSB a été synthétisé selon la méthode de RADULESCU par hydrolyse du phénylindanedione acétate d'éthyle.



Ce composé à été testé à différentes concentrations sur la croissance de Staphylococcus aureus ; seule la concentration 10^{-2} M semble inhibitrice. (*)

Cette réaction a attiré notre attention sur la possibilité de préparer des OSB substitués sur le carbone 3, qui pourraient avoir un intérêt biologique important comme inhibiteurs dans la biosynthèse des ménaquinones.

(*) Nous remercions Mme GUESPIN pour l'aide apportée dans la réalisation de ces tests et M. E.BOSCHETTI pour le don d'acide phénylindanedione acétique.

Pour ces raisons, il n'a pas paru intéressant de préparer cet acide marqué, mais l'acide froid a pu être utilisé dans des expériences de dilution de l'incorporation de l'OSB marqué.

CHAPITRE II

ISOLEMENT et DEGRADATIONS des MENAQUINONES BACTERIENNES et des QUINONES VEGETALES

Isolement des quinones

L'isolement des quinones naturelles est décrit dans la partie expérimentale. La purification des quinones marquées ayant incorporé la radioactivité d'un précurseur éventuel doit être la plus parfaite possible : dans le passé, surtout en ce qui concerne les ménaquinones, il a été rapporté certaines incorporations erronées (1,45) en raison de la présence de très faibles quantités d'esters ou autres impuretés radioactives, contaminant les quinones isolées. En ce qui concerne les ménaquinones et la lawsone, les impuretés ont parfois été difficiles à éliminer : dans le premier cas, il a fallu faire appel à la chromatographie en phase inversée ; dans le second, à la préparation du dérivé réduit puis acétylé (triacétoxy-1,2,4 naphtalène) purifié ensuite par chromatographie.

La purification de la juglone par contre n'a posé aucun problème ; il en a été de même pour les quelques anthraquinones isolées au cours de ce travail.

Dans tous les cas où une radioactivité importante était incorporée, il devenait possible, en vue de dégradations complexes, de diluer considérablement la quinone radioactive avec le composé correspondant non marqué, puis d'effectuer une ou plusieurs purifications, par chromatographie ou par cristallisation jusqu'à obtenir une activité spécifique constante. Cette méthode a été utilisée dans certains cas et les activités spécifiques figurant dans les tableaux de dégradation correspondants sont celles mesurées après dilution.

.../...

Le comptage par scintillation liquide de la radioactivité nécessaire à la détermination de l'activité spécifique de certaines de ces quinones a parfois été gêné par la coïncidence de leur longueur d'onde d'absorption avec celle d'émission des scintillateurs utilisés (surtout par des quantités de quinones supérieures à 1 mg). On a généralement tourné cette difficulté en préparant les dérivés réduits des quinones manifestant ces propriétés (addition de borohydrure avant celle du scintillateur, ou comptage des dérivés acétylés...).

La détermination des quantités de quinones, nécessaire à la mesure de l'activité spécifique, a été faite soit par pesée, soit par spectrométrie U.V. ou visible : dans ce cas, on a toujours déterminé au préalable l'absorption moléculaire de la substance étudiée dans les mêmes conditions de mesure (solvants, appareils...).

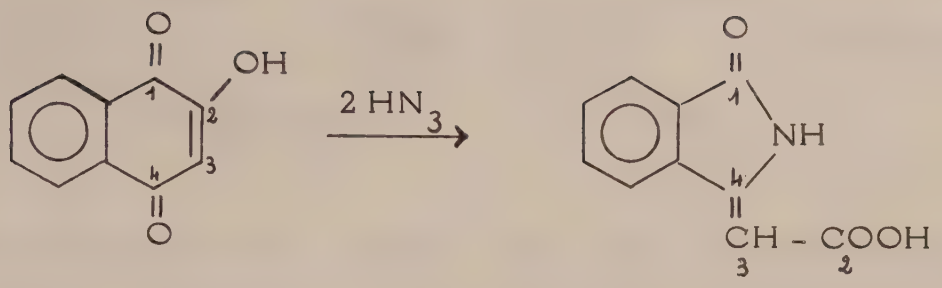
Dégradation des quinones

Au début de notre travail, nous utilisions une méthode d'oxydation globale des quinones en acide phtalique, soit par le permanganate alcalin, soit par l'eau oxygénée alcaline. Mais du fait de la symétrie de la molécule de l'acide phtalique, il est impossible dans une dégradation ultérieure de différencier ses carboxyles, donc de préciser la position exacte de certains atomes marqués dans les quinones. Ceci nous a amené a rechercher des précurseurs capables d'un marquage asymétrique et à mettre au point une dégradation asymétrique des naphtoquinones.

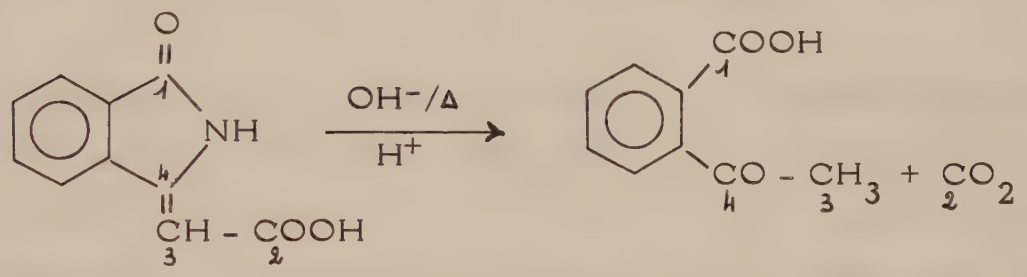
Dégradation de la lawsone

Une publication de MOORE et SHELDEN (72) montrant que la lawsone (hydroxy-2 naphtoquinone-1,4) réagit avec l'acide azothydrique pour donner l'acide phtalimidène acétique a été le point de départ de cette dégradation. Le mécanisme proposé et les intermédiaires isolés indiquent une répartition des carbones initiaux conforme au schéma suivant :

.../...

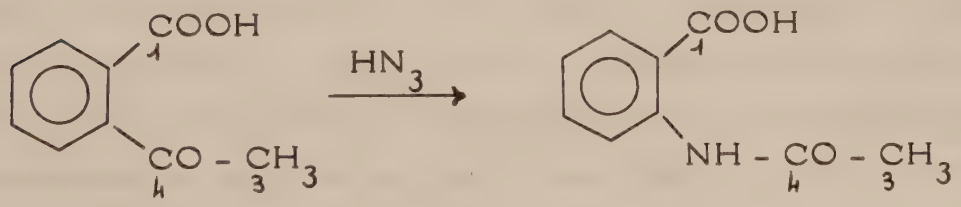


Par ailleurs W. ROSER a montré que cet acide est hydrolysé et décarboxylé par la soude à reflux en acide acétophénone carboxylique (79a) [-] probablement sous sa forme cyclisée hydroxy-3 méthyl-3 phtalide [-].



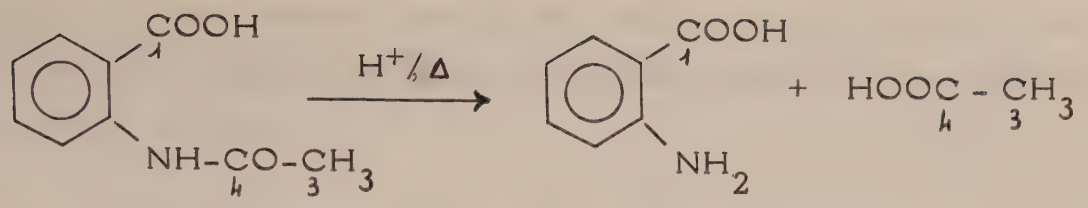
Nous avons dégradé cette acétophénone de deux manières :

1°) par l'acide azothydrique (réaction de SCHMIDT) qui conduit, avec un excellent rendement, à l'acide N-acétyl anthranilique obtenu cristallisé (F = 184° C), identifié par ses spectres UV et IR et comparaison avec le produit synthétique (74).

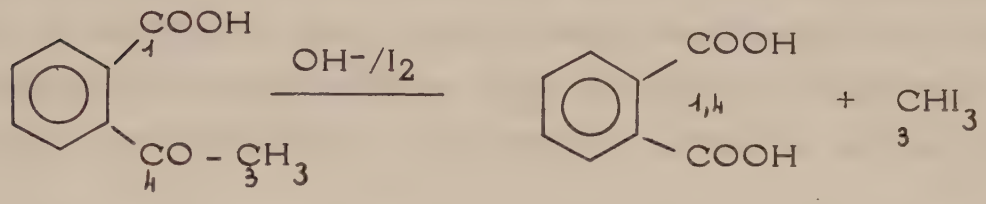


L'acide N-acétyl anthranilique est quantitativement hydrolysé en milieu acide ; l'acide acétique est récupéré par entraînement à la vapeur et l'acide anthranilique extrait est purifié par cristallisation ou sublimation.

.../...



2°) par l'iode en milieu alcalin, nous avons dégradé l'acide acétophénone carboxylique en acide phtalique et iodoforme.



L'ensemble de ces réactions constitue une excellente méthode de dégradation carbone par carbone du noyau quinonique de la lawsone ; le carbone 2 étant d'abord éliminé sous forme de CO_2, le carbone 3 sous forme d'iodoforme, les carbones 3 et 4 sous forme d'acide acétique et le carbone 1 sous forme d'acide anthranilique.

Dégradation de la ménaquinone

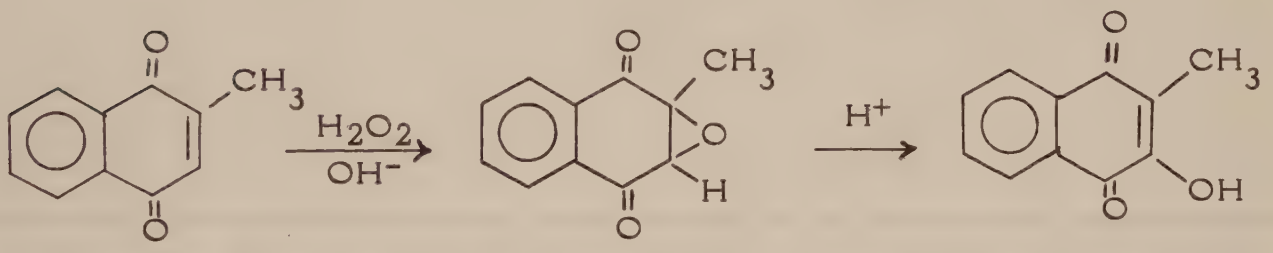
Il restait à trouver une dégradation analogue pour les ménaquinones. Nous avons d'abord étudié la dégradation d'une ménaquinone par l'oxydation de KUHN-ROTH (83). Celle-ci transforme le méthyle -2' porté par le carbone -2, ainsi que les méthyles isoprényques en acide acétique. Malheureusement le rendement de ces transformations n'est pas comparable et entache de trop d'incertitude l'activité spécifique du carbone C - 2 ainsi mesurée. Seule l'activité totale dans ce cas peut donner une indication sur l'incorporation dans le carbone C - 2 : dans des dégradations antérieures (2,46,57) le rendement en acide acétique correspondant a été évalué à 70-75 %.

.../...

L'existence d'une réaction connue des ménaquinones a permis de surmonter cette difficulté en ramenant la dégradation de ces molécules à celle de la lawsone:

Nous avons donc développé une autre méthode utilisant la transformation de la ménaquinone en phtiocol. FIESER a montré que la réaction de DAM-KARRER (32) permettant de caractériser et de doser colorimétriquement les vitamines K était basée sur la formation en quantités faibles de phtiocol (méthyl-2 hydroxy-3 naphtoquinone-1,4). En fait, le traitement alcalin des ménaquinones fournit des quantités négligeables de phtiocol (32a) au point que celui-ci trouvé dans les extraits de Mycobacteries a été considéré comme un artefact (32b).

Mais le phtiocol lui-même peut être préparé avec un excellent rendement par traitement acide de l'époxy-2,3 méthyl-2 naphtoquinone-1,4 (33).



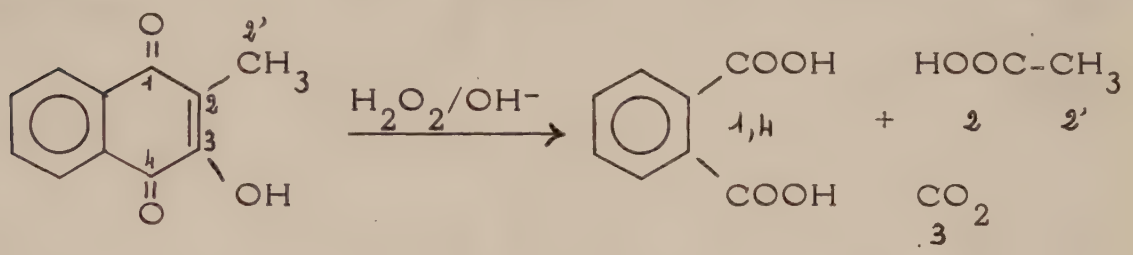
Par analogie avec cette réaction, nous avons pensé que la réaction de DAM-KARRER, ou l'isolement de phtiocol naturel, tous deux réalisés en milieu alcalin en présence d'air, devaient passer par l'intermédiaire de l'époxyde de ménaquinone. Cette molécule est facile à préparer quantitativement par action d'eau oxygénée en milieu faiblement alcalin. L'époxyde chauffé en milieu alcalin fort (mieux qu'en milieu acide) fournit des quantités notables de phtiocol, facilement identifiable après extraction par son spectre UV, son point de fusion et ses propriétés chromatographiques.

.../...

L'utilisation d'un mélange méthanol-dioxane-eau capable de dissoudre à la fois l'époxyménaquinone et la potasse concentrée améliore nettement la reproductibilité et le rendement de la réaction. On obtient jusqu'à 65 % de phtiocol à partir de la dihydroménaquinone-9 (MK-9[II H_2]).

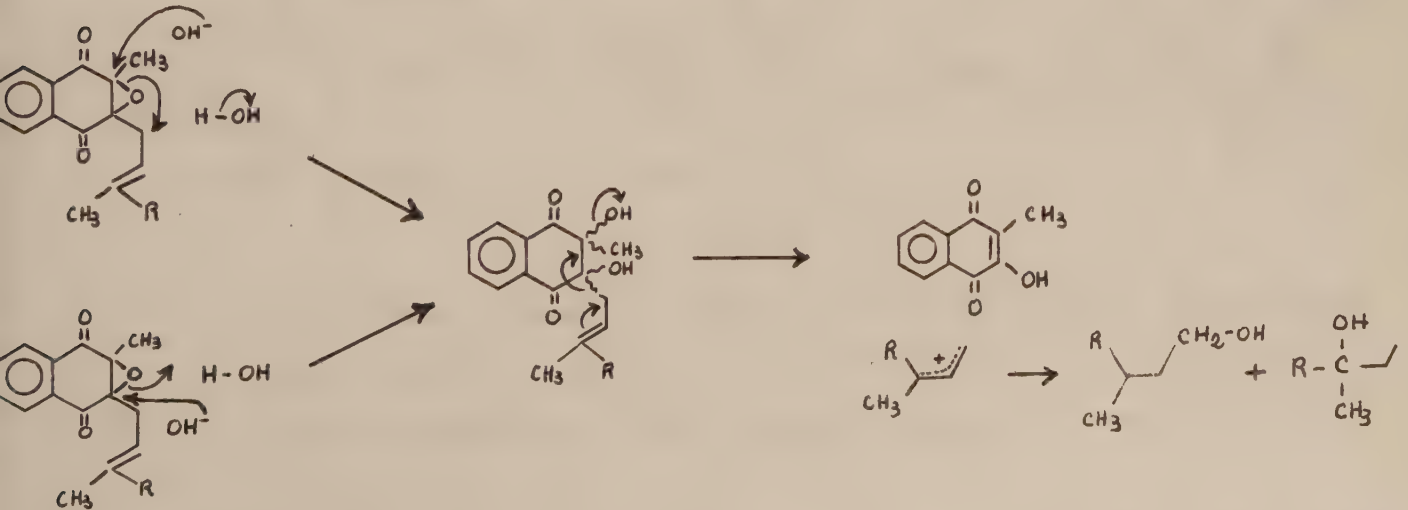
Le phtiocol ainsi obtenu a été dégradé de deux façons :

1°) par oxydation par l'eau oxygénée alcaline en acide phtalique, acide acétique et CO_2 selon le schéma ci-dessous : le carbone 2 porteur du méthyle donne l'acide acétique, et le carbone 3 le gaz carbonique.



.../...

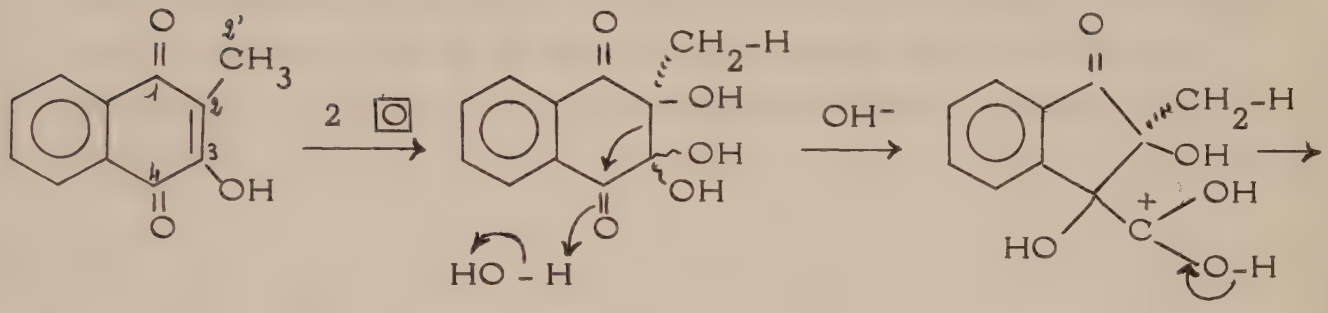
Le mécanisme de la réaction qui conduit à la coupure d'une liaison C-C, est probablement celui décrit dans le schéma ci-dessous, où la présence d'une double liaison en β-γ dans la chaîne facilite l'élimination du carbocation allylique provenant de la chaîne, stabilisé par résonance.

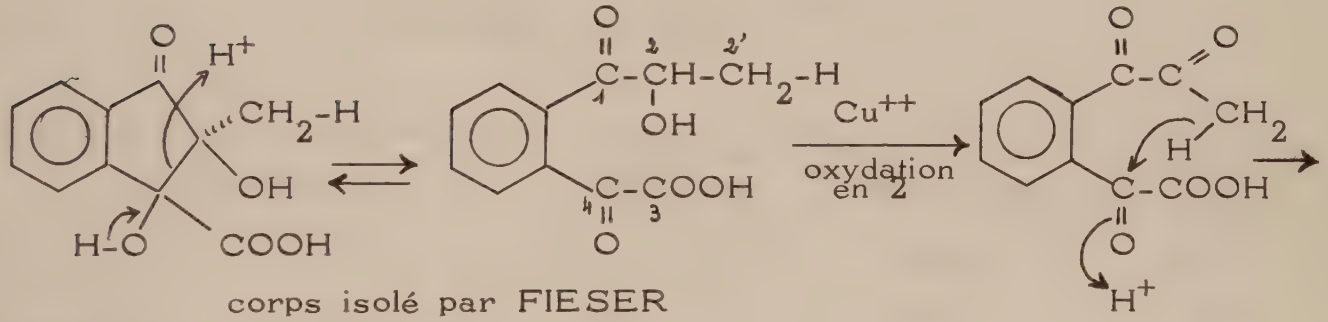


La vérification expérimentale d'un tel mécanisme est en cours : elle implique l'étude de la même réaction sur des quinones β-γ hydrogénées et l'isolement d'un mélange d'alcools polypréniques primaires et tertiaires.

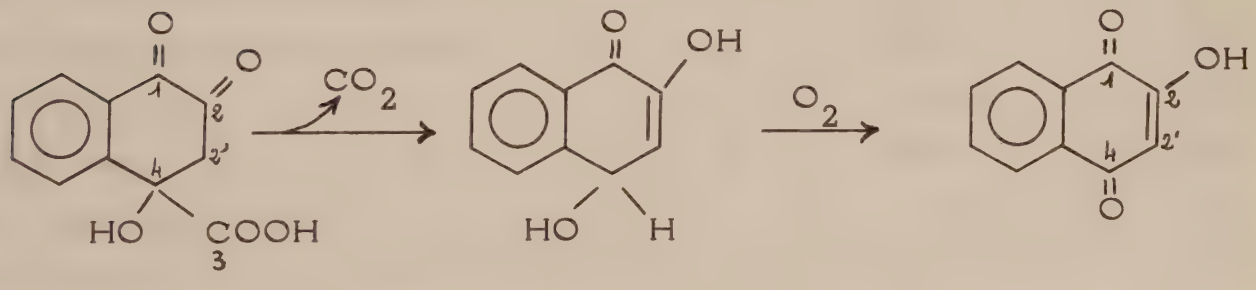
Le gaz carbonique formé étant dilué par celui provenant de l'oxydation d'autres atomes de carbone voit sa radioactivité entachée par une erreur systématique indéterminée.

2°) par oxydation permanganique aboutissant à la lawsone suivant la réaction décrite par HOOCKER en 1936 (54) et dont le mécanisme proposé par FIESER (34) est le suivant :





corps isolé par FIESER



Dans cette réaction, le carbone -3 du phtiocol est éliminé sous forme de CO_2 et lors de la reformation du cycle quinonique, c'est le méthyle en 2' qui devient le carbone -3 de la lawsone.

.../...

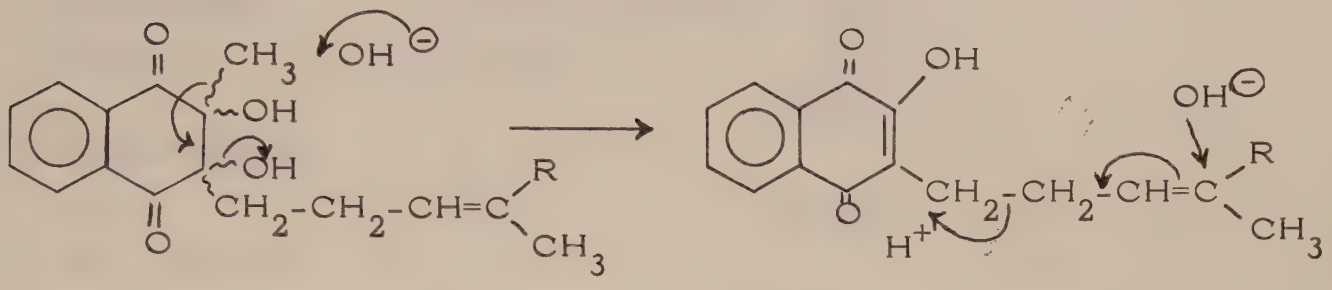
Ce schéma a été déduit de l'isolement par FIESER de certains intermédiaires ; il était indispensable pour notre dégradation d'être certain de l'origine de chacun des carbones 1,2,3,4 de la lawsone (et en particulier des carbones 2 et 3). Pour cela, nous avons préparé l'époxyde-2,3 de la méthyl-2 naphtoquinone-1,4 $^{14}CH_3$-2' qui a été hydrolysé en phtiocol $^{14}CH_3$-2'. Celui-ci a été transformé en lawsone par la réaction de HOOCKER (rendement 50 %) et celle-ci dégradée carbone par carbone, comme décrit précédemment. Les résultats donnés dans le tableau ci-dessous indiquent clairement que le carbone C-3 de la lawsone est porteur de la totalité du marquage, en accord avec le schéma mécanistique proposé par FIESER.

Dégradation du phtiocol $^{14}CH_3$-2'

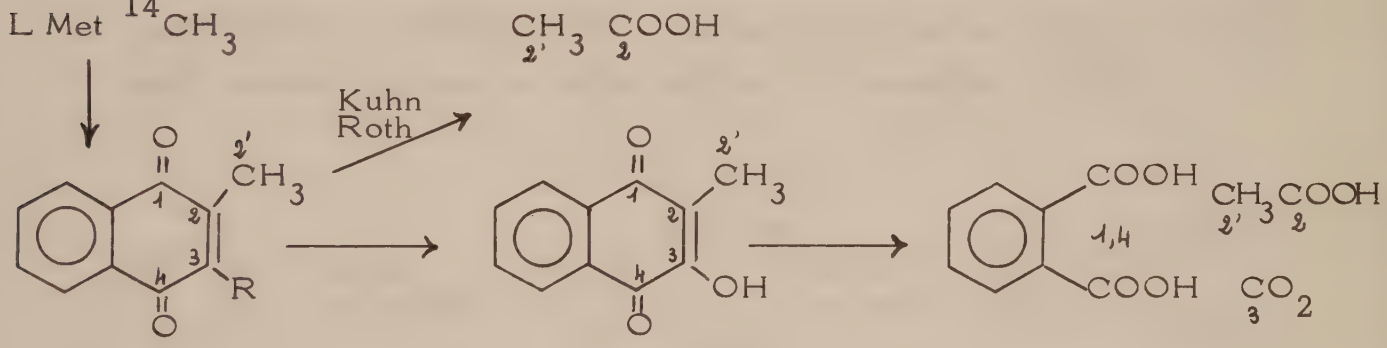
Molécule	Carbones conservés	Act. spéc. dpm/µmole	% rétention
Phtiocol.....	1 2 3 4 2'	1 880	100
Lawsone.....	1 2 4 2'	1 850	98,5
Ac. phtalimidène acétique..	1 2 4 2'	1 860	99
Ac.acétophénone carboxylique	1 4 2'	1 840	98
CO_2	2	2,3	0,15
Iodoforme	2'	1 800	95,5
Ac. phtalique.....	1 4	5,5	0,3
Ac. acétique	2 2'	1 850	98,5
CO_2	3	34	2
Ac. phtalique.....	1 4	6	0,3

.../...

Une dernière incertitude pouvait subsister : la transformation de la ménaquinone en phtiocol ne pouvait-elle pas se faire partiellement par formation du groupement méthyle à partir du premier méthylène de la chaîne (hypothèse peu probable).



Afin de répondre à cette question, nous avons transformé la dihydro-ménaquinone-9 de M. phlei marquée in vivo par la L-méthionine -$^{14}CH_3$ en phtiocol. Il a été montré précédemment (46) que cette ménaquinone est à peu près spécifiquement marquée sur le méthyle -2'.



Le phtiocol a été oxydé en acide acétique + acide phtalique + CO_2, et le tableau suivant montre que 85 % de la radioactivité de la ménaquinone se retrouvent dans le phtiocol, ce qui est tout à fait en accord avec les incorporations du méthyle de la méthionine dans le méthyle de la ménaquinone précédemment décrite ; la faible radioactivité observée dans le CO_2 et l'acide phtalique rend compte de la randomisation des 15 % restants de l'activité spécifique. Ce résultat écarte toute possibilité d'interversion des carbones 2 et 3 au cours de la transformation de la vitamine K en phtiocol.

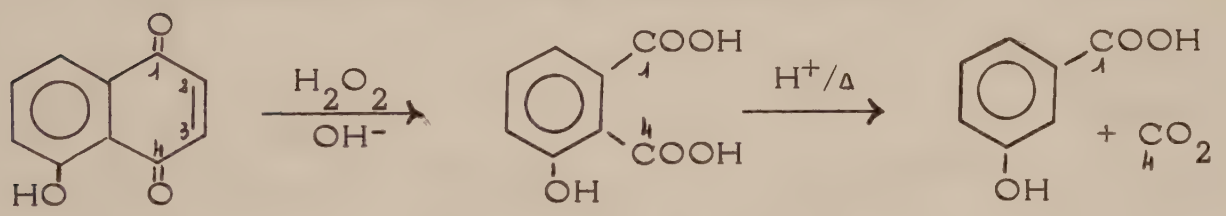
.../...

Dégradation de la ménaquinone marquée par la méthionine

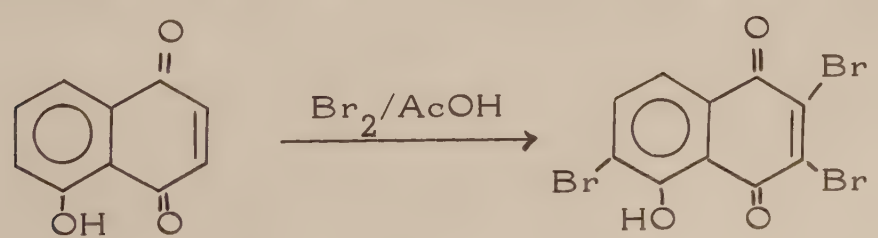
Molécule	Carbones conservés	Act. spéc. dpm/µmole	% rétention
Ménaquinone	1 2 3 4 2' + chaîne	6 760	100
Phtiocol	1 2 3 4 2'	5 820 dilution → 415	86
Acide acétique	2 2'	402	83
CO_2	3	par excès 8,9	2
Ac. phtalique	1 4	7,8	2

Dégradation de la juglone

La juglone a été dégradée suivant la méthode déjà décrite par LEISTNER et ZENK (65) : oxydation en acide hydroxy-3 phtalique, puis décarboxylation en acide hydroxy-3 benzoïque et CO_2.



Par ailleurs, pour préciser la position du tritium incorporé sur le noyau A de la juglone, nous avons utilisé la bromuration en tribromo-2,3,6 juglone (92) ; la position



du brome sur le noyau A étant confirmée par le spectre RMN (93).

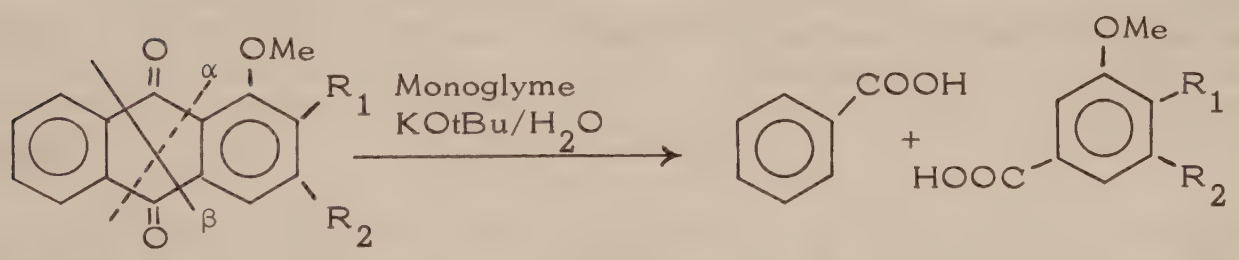
.../...

Dégradation des anthraquinones

La dégradation des anthraquinones dont les noyaux A et B dérivent de la naphtoquinone (60,63) a été faite selon une méthode récente décrite par HOODGE et DAVIS (24,25) : en présence de potasse naissante obtenue par action de l'eau sur le tertiobutylate de potassium dans le diméthoxy-1,2 éthane (monoglyme), les anthraquinones sont hydrolysées en deux molécules d'acides benzoïques substitués. Il est très important dans cette réaction d'utiliser du monoglyme parfaitement anhydre, pour éviter la formation d'alcool tertiobutylique inhibiteur.

La position des substituants et leur nature oriente la coupure du noyau B, de sorte qu'on n'obtient que quelques-uns des acides benzoïques possibles, aisément identifiables et isolables par chromatographie.

Cette méthode, qui a été aussi utilisée dans un but de dégradation par LEISTNER (67), nous a permis de dégrader l'alizarine ^{14}C et la xanthopurpurine ^{14}C de Rubia tinctorum.



1°) R_1 = OMe R_2 = H 2°) R_1 = H R_2 = OMe

CHAPITRE III

INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS LES MENAQUINONES BACTERIENNES

A - Au début de notre travail, nous avons essayé d'incorporer dans les ménaquinones bactériennes plusieurs métabolites marqués de l'acide shikimique.

Comme le montre le tableau I, l'incorporation des aldéhydes p-hydroxy-benzoïque ^{14}C et dihydroxy-3,4 benzoïque ^{3}H dans les ménaquinones de diverses bactéries Gram^{+} et Gram^{-}, pendant la croissance ou en "resting-cells" s'est révélée négative tandis que l'aldéhyde p-hydroxy-benzoïque est un bon précurseur du noyau de l'ubiquinone chez Proteus vulgaris (*).

Tableau I

Incorporation d'aldéhydes aromatiques dans les quinones bactériennes

Bactérie	p OH benz-aldéhyde µ Ci	di OH benz-aldéhyde µ Ci	Ménaquinone	Activité spécifique dpm/µmole	Ubiquinone	Activité spécifique dpm/µmole
M. avium	11		MK-9(H_2)	0	-	-
		1	"	0	-	-
P.vulgaris	1		MK-8	0	Q - 8	652
		0,2	"	0	"	0
"Resting-cells" P.vulgaris	10		"	0	"	2364
		1	"	0	"	0
A.aerogenes 170-44		1	MK-8	0	Q - 8	0
"Resting-cells" A.aerogenes 170-44		1	"	0	"	0

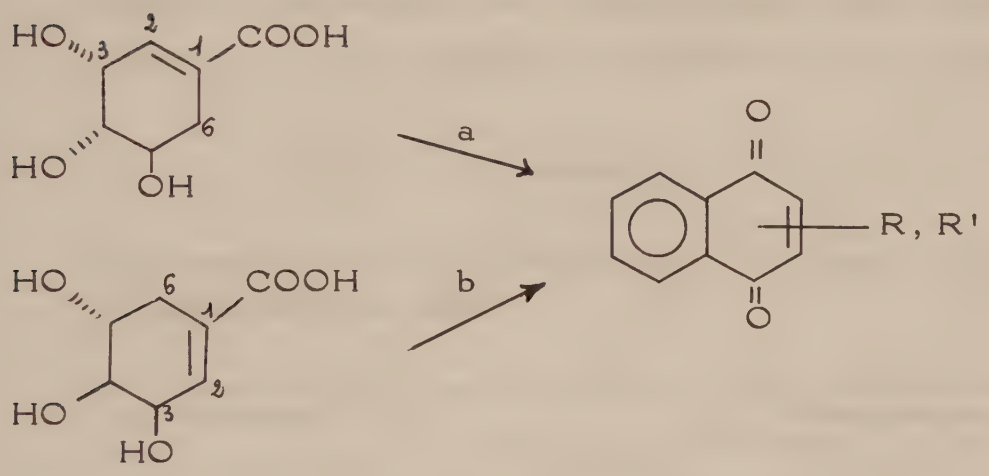
.../...

(*) Plusieurs des incorporations décrites ci-dessus ainsi que la dégradation de la ménaquinone marquée par l'acide shikimique ^{3}H-3 ont été effectuées en collaboration avec Mlle M. LEDUC, dans le cadre de sa thèse de Spécialité de Chimie Biologique soutenue à Orsay le 15.7.1970. Ces résultats ont également été publiés (59).

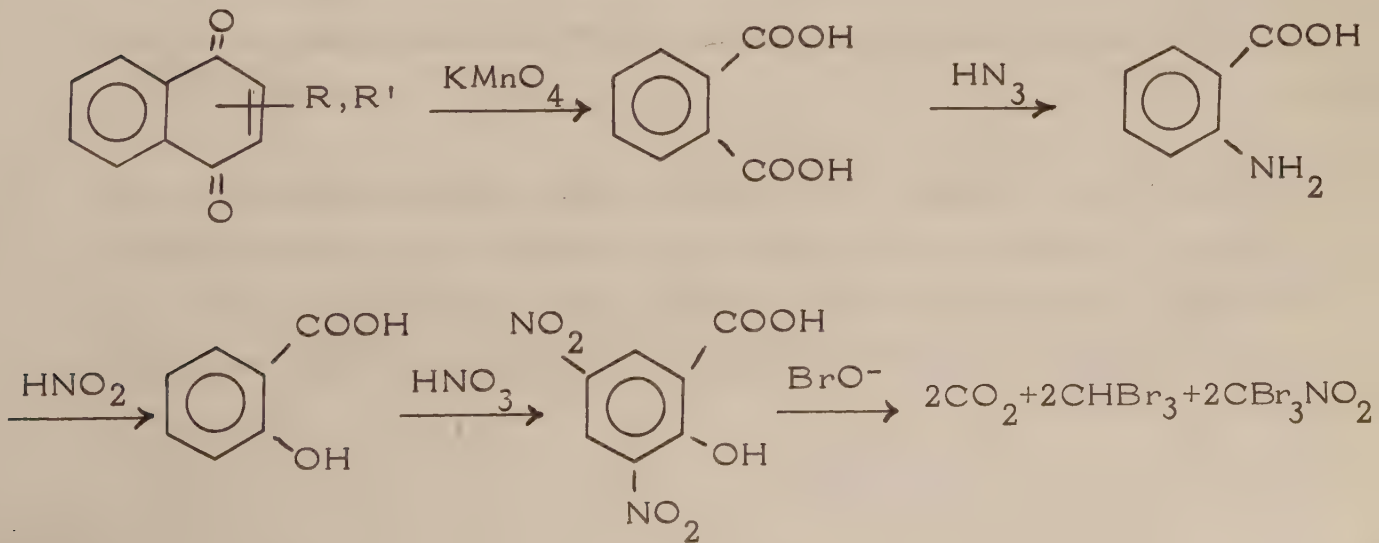
B - Incorporation d'acide shikimique ^{3}H-3

Dans différents laboratoires, on avait montré que l'acide shikimique ^{14}C-U s'incorpore <u>in toto</u> dans les ménaquinones de telle sorte que le carboxyle de l'acide shikimique devienne un carbonyle de la quinone (12,17,59).

Cette incorporation peut se faire selon deux orientation différentes et la question se pose donc de savoir sur lequel des deux carbones 2 ou 6 adjacents au carbone 1 porteur du carboxyle de l'acide shikimique, se ferme le cycle naphtoquinonique.



Pour résoudre ce problème, M. LEDUC, dans notre laboratoire, avait incorporé de l'acide shikimique ^{14}C-1,6 commercial dans la ménaquinone de <u>M. phlei</u>, et dégradé cette molécule en cinq étapes en bromopicrine selon le schéma ci-dessous :



.../...

Un travail de BIRCH signalait cependant que la bromopicrine (tribromonitrométhane) pouvait contenir des quantités importantes de bromoforme provenant d'autres atomes de carbone, difficile à séparer du tribromométhane, et par conséquent risquant de fausser les résultats de cette dégradation. C'est pourquoi nous avons pensé que l'incorporation d'acide shikimique ^{3}H-3 dans la ménaquinone permettrait une dégradation plus directe donc plus précise. La synthèse de cet acide shikimique est décrite au chapître I, et dans l'étude présente, nous avons utilisé le mélange de shikimate ^{3}H-3 et d'épishikimate ^{3}H-3 (contenant 28 - 30 % de shikimate). Depuis, nous avons pu montrer que l'acide épishikimique n'est pas métabolisé par les bactéries étudiées (les résultats de l'incorporation sont rapportés dans le tableau II), ce qui légitime les résultats de nos expériences.(59).

Tableau II

Incorporation d'acide D-shikimique ^{3}H-3 dans la dihydroménaquinone de Mycobacterium phlei.

Shikimate ^{3}H-3	Ménaquinone		
µ Ci *	µmole	dpm/µmole	% incorporation
** 72 µ Ci	16,6	8 600	0,10
** 39 µ Ci	12	5 800	0,11

* Radioactivité correspondant à l'acide D-shikimique ^{3}H-3 seul dans le mélange shikimate - épishikimate.

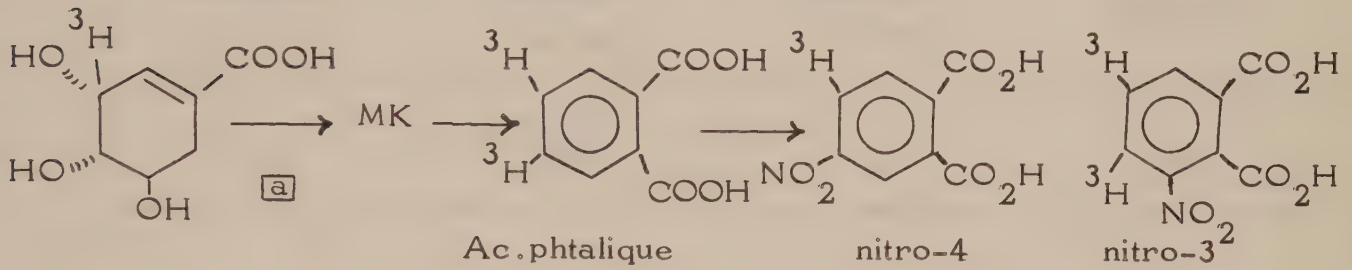
** 2 l de milieu de SAUTON, culture en surface pendant 7 jours à 37° C.

La d hydroménaquinone ainsi obtenue a été dégradée par oxydation en acide phtalique et par nitration de celui-ci en un mélange d'acides nitro-3 et -4 phtaliques. Afin d'éviter des erreurs dans la détermination de l'activité spécifique de petites quantités de ces acides,

.../...

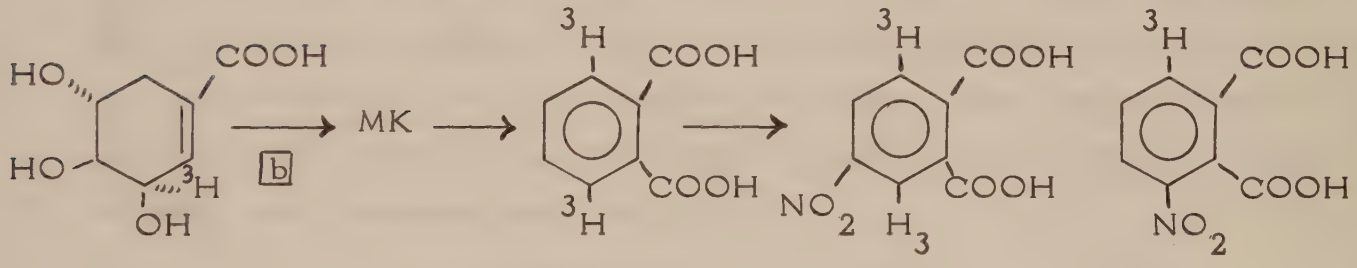
l'acide phtalique tritié provenant de la dégradation a été dilué avec de l'acide phtalique - $^{14}COOH$, d'activité spécifique connue, avant nitration. De cette manière, seuls les rapports ^{3}H / ^{14}C ont été mesurés dans les produits nitrés et ces rapports permettent de comparer directement la teneur en tritium de chaque produit.

Si nous examinons le taux de rétention du tritium dans chaque hypothèse, nous remarquons que (*) :



Ac.phtalique nitro-4 nitro-3

Act.spéc. 1 0,5 1



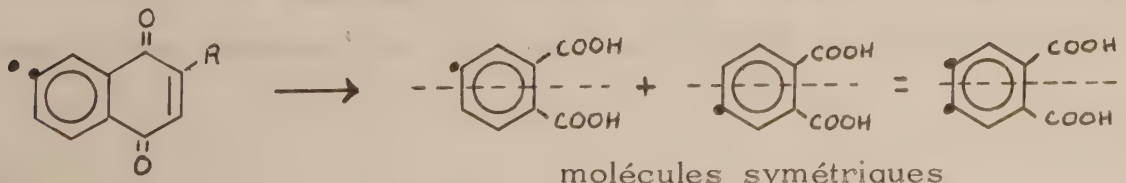
Ac.phtalique nitro-4 nitro-3

Act.spéc. 1 1 0,5

dans l'hypothèse [a] (fermeture du cycle sur les carbones 1 et 6 de l'acide shikimique), le rapport de l'activité spécifique en tritium des dérivés nitro-4 / nitro-3 est égal à 0,5 alors que dans l'hypothèse [b] (fermeture sur les carbones 1 et 2) ce rapport est égal à 2.

.../...

(*) Il faut remarquer que lorsqu'on passe d'une naphtoquinone marquée en une position donnée du noyau A, à l'acide phtalique, celui-ci étant une molécule symétrique, son marquage se trouve réparti symétriquement.



molécules symétriques

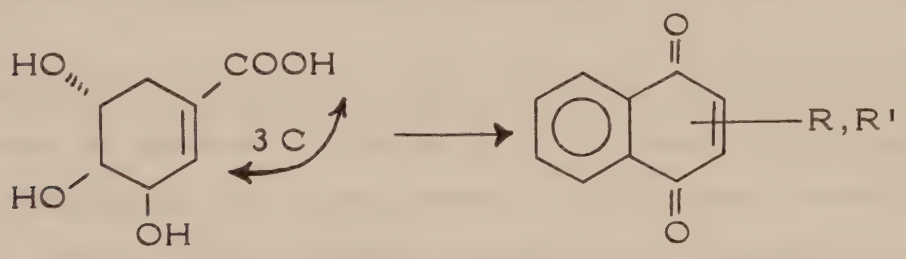
Les résultats de la dégradation sont réunis dans le tableau III (59).

Tableau III

Dégradation de la dihydroménaquinone de M. phlei marquée par le shikimate ^{3}H-3

Acide phtalique $^{3}H/^{14}C$	Acide nitro-3 phtalique $^{3}H/^{14}C$	Acide nitro-4 phtalique $^{3}H/^{14}C$	Rapport $\frac{\text{nitro-4}}{\text{nitro-3}}$
1,22	0,59	1,17	1,99

Ils confirment de manière catégorique ceux déjà obtenus par M. LEDUC avec l'acide shikimique ^{14}C-1,6, à savoir que l'hypothèse [b] est la seule valable et donc que le noyau quinonique se ferme sur les carbones 1 et 2 de l'acide shikimique. Ainsi les carbones de la double liaison de l'acide shikimique deviennent communs aux deux noyaux de la ménaquinone MK-9 (H_2).



C - L'acide chorismique, intermédiaire probable dans la biosynthèse des ménaquinones.

Certains des résultats obtenus par GIBSON (17) avec des mutants aromatiques de Aerobacter aerogenes et répétés au laboratoire avec les mêmes mutants ainsi qu'avec des mutants aromatiques de

.../...

Escherichia coli W (B.D. DAVIS) ou de Bacillus subtilis (D.L. NASSER), indiquaient nettement que l'acide chorismique, qui constitue un point de branchement dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques (schéma 1), était également un intermédiaire sur la voie de biosynthèse des ménaquinones bactériennes, la bifurcation pouvant se situer soit à son niveau, soit au niveau moins probable du préphénate, ou d'un de ses métabolites (38). Le détail des arguments présentés est développé au chapître VI (Discussion).

D - Participation du groupement énoylpyruvique de l'acide chorismique à la synthèse du noyau naphtoquinonique.

Si l'acide chorismique est intermédiaire dans cette biosynthèse, il est tentant de penser que les trois carbones manquant à l'acide shikimique pour terminer le cycle naphtoquinonique sont ceux du groupe énoylpyruvique de l'acide chorismique. Rappelons que la chorismate-mutase catalyse une transposition de groupe énoylpyruvique sur le carbone 1 du chorismate, de sorte que ce groupe est à l'origine des trois carbones non aromatiques de la phénylalamine et de la tyrosine. Cette transposition a été interprétée comme un réarrangement de CLAISEN à six centres ("No - mechanism" Reactions) (28, 53a).

Le transfert direct du groupe énoyl-pyruvique du carbone -3 de l'acide chorismique au carbone -6 (siège de la fermeture du cycle quinonique *) impliquant un réarrangement à sept centres semblait peu probable ; mais il était possible d'imaginer par exemple la formation préalable d'un acide iso-4 chorismique. Son réarrangement par le mécanisme précédent, suivi d'une déshydratation conduirait alors à l'acide o-carboxyphénylpyruvique (59).

.../...

(*) Du fait de la nomenclature chimique, le carbone -2 de l'acide shikimique devient le carbone -6 de l'acide chorismique.

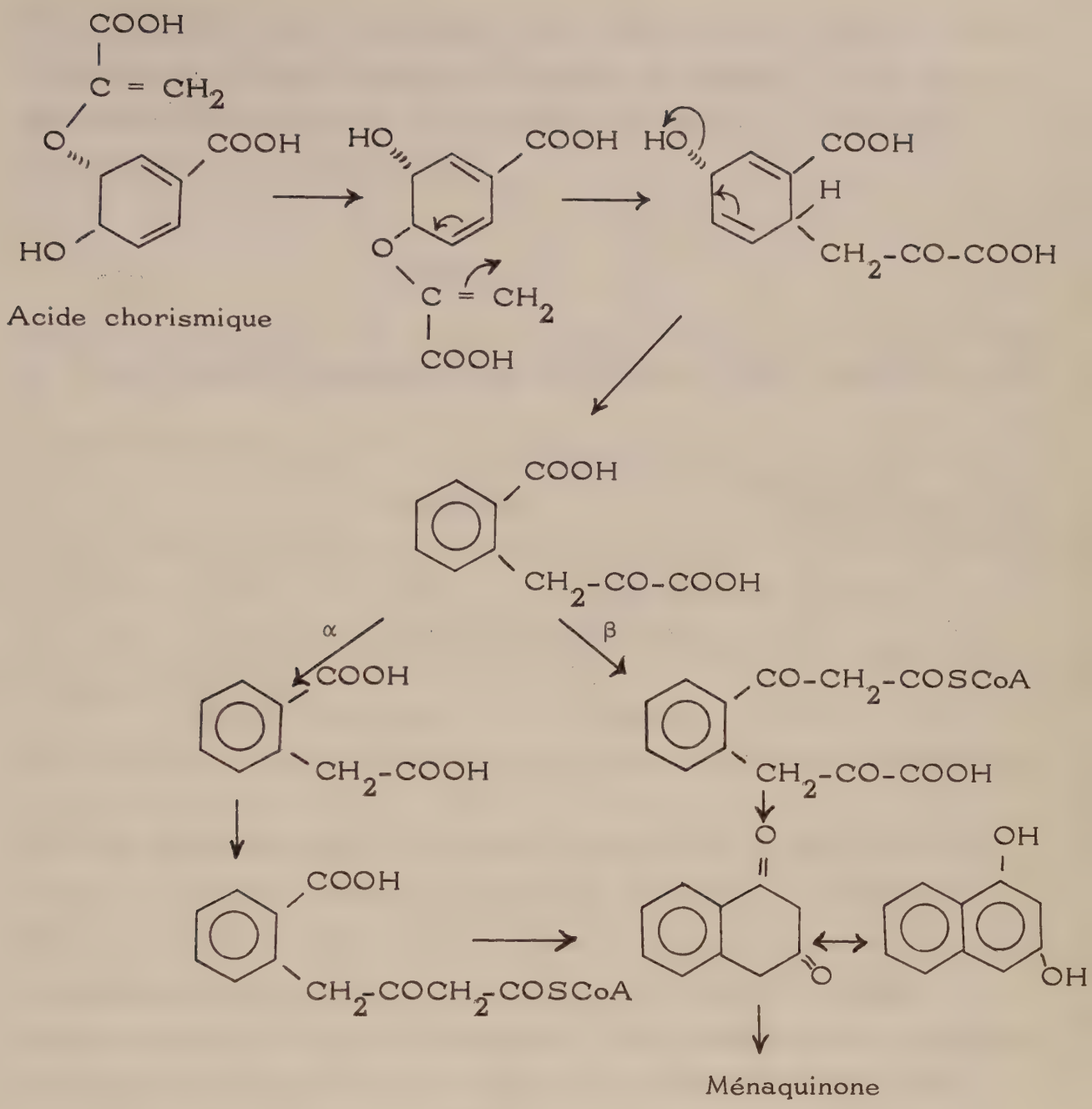


Schéma 1

En poursuivant ce schéma par la décarboxylation oxydative de l'acide o-carboxyphénylpyruvique en acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique, condensation de malonyl CoA, cyclisation de CLAISEN et décarboxylation, on obtient le naphtalènediol-1,3, produit utilisé comme substitut de la vitamine K par l'auxotrophe Bacteroides melaninogenicus (69,70).

.../...

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, au laboratoire, essayé d'incorporer l'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique ^{14}C-1 dans différentes ménaquinones. Les résultats du tableau IV ôtent toute vraisemblance à cette hypothèse.

Tableau IV

Essai d'incorporation de l'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique ^{14}C-1 et de ses esters méthyliques dans les ménaquinones bactériennes (*)

		Organisme	Ménaquinone	µmole	dpm/µmole
Acide	10 µ Ci	M. phlei	MK-9(H_2)	8,2	11
	10 µ Ci	A.aerogenes 170-44	MK-8	0	0
Esters méthyliques	10 µ Ci	M.phlei	MK-9	4,4	13

On peut aussi concevoir un schéma alternatif ne passant pas par l'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique, mais par la condensation directe du malonyl CoA sur le carboxyle aromatique de l'acide o-carboxyphénylpyruvique, cyclisation de CLAISEN et double décarboxylation. Dans cette hypothèse, deux seulement des carbones du groupe énoylpyruvique (le CH_2 et le carbonyle) doivent être incorporés dans le noyau naphtoquinonique, donnant respectivement un des carbonyles et un des carbones 2 ou 3.

.../...

(*) Les incorporations de l'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique et de ses esters chez les bactéries, rapportées dans le tableau IV ont été effectuées en collaboration avec Mme M. GUERIN, dans le cadre de sa thèse de Doctorat ès-sciences, soutenue le 8.7.1971 à Orsay. (47).

Il était possible de préparer de l'acide chorismique marqué au tritium dans le noyau (à partir de shikimate ^{3}H-3) et au ^{14}C dans le groupe énoylpyruvique, mais GIBSON a montré que l'acide chorismique ne peut pénétrer dans les bactéries, même pour remplacer l'acide p-aminobenzoïque (nécessaire à une concentration de 10^{-8} M seulement) (38). Donc, afin de suivre simultanément et sélectivement le devenir du noyau et du groupe énoylpyruvique, il était nécessaire de trouver un artifice pour marquer in vivo l'acide chorismique.

Nous utilisons le mutant 83-1 de Escherichia coli, bloqué au niveau de la déhydroquinase, c'est-à-dire incapable de synthétiser le shikimate, et nous cultivons cette bactérie sur un milieu minimal, supplémenté en tryptophane, tyrosine, p-hydroxybenzoate et p-aminobenzoate, avec pour seules sources de carbone du lactate et de l'acétate, auxquels nous ajoutons du shikimate ^{3}H-3 et du glucose ^{14}C.

Dans ces conditions, le noyau du chorismate doit provenir exclusivement du shikimate ^{3}H-3, tandis que le groupe énoylpyruvique contient du ^{14}C. La phénylalanine qui contient tous les atomes de carbones de l'acide chorismique, ainsi que tout le tritium provenant de la position 3 du shikimate, doit refléter exactement le rapport carbone / tritium du chorismate. De même, si la ménaquinone incorpore directement le chorismate in toto, sans élimination préalable du groupe énoylpyruvique, son rapport carbone / tritium doit refléter celui du chorismate, corrigé du nombre de carbones du groupe énoylpyruvique éventuellement incorporé (2/3 dans chacune des deux hypothèses).

Le tableau V donne les résultats de cette incorporation effectuée soit en présence de glucose ^{14}C-1 (marquant uniquement le CH_2 du groupe énoylpyruvique), soit en présence de glucose ^{14}C-U (marquant également les trois carbones du groupe énoylpyruvique).

.../...

Tableau V

Double marquage des ménaquinones, ubiquinones, phénylalanine et leucine en présence de SKA 3 ^{3}H et glucose ^{14}C, chez E. coli

Précurseur	MK-8		Q-8		Acide phtalique			DNP-phénylalanine			Produits de dégradation de la phénylalanine		Leucine	
	^{3}H dpm/nmole	^{14}C dpm/nmole	^{3}H dpm/nmole	^{14}C dpm/nmole	^{3}H dpm/nmole	^{14}C dpm/nmole	$^{14}C/^{3}H$	^{3}H dpm/nmole	^{14}C dpm/nmole	$^{14}C/^{3}H$	phényl-acétate $^{14}C/^{3}H$	benzoate $^{14}C/^{3}H$	^{3}H dpm/nmole	^{14}C dpm/nmole
I - Shikimate ^{3}H-3 + Glucose ^{14}C-1	280 (32,4 nmoles)	224	5 (124 nmoles)	241	282	10	0,0354	304	19,6	0,0645	0,068	0,060	1,1	19
II - Shikimate ^{3}H-3 + Glucose ^{14}C-1 + OSB	69 (82,8 nmoles)	222	10 (66,3 nmoles)	419	-	-	-	287	21,8	0,076	0,088	0,071	0,1	26
III - Shikimate ^{3}H-3 + Glucose ^{14}C-U	275 (30,7 nmoles)	770	7 (134 nmoles)	1 190	254	14,5	0,057	283	112	0,396	0,227	0,125	1,3	84
IV - Shikimate ^{3}H-3 + Glucose ^{14}C-U + OSB	35 (90 nmoles)	625	19 (71 nmoles)	2 263	-	-	-	289	128	0,442	0,200	0,138	1,7	90

Cependant, malgré l'addition d'acétate et de lactate au milieu de culture pour diminuer l'incorporation par randomisation du glucose ^{14}C dans les chaînes polyisopréniques, on retrouve une radioactivité importante en ^{14}C dans la chaîne latérale des quinones isolées : ménaquinone MK-8 et ubiquinone Q-8. C'est pourquoi il a été nécessaire d'éliminer cette chaîne pour les mesures envisagées. La ménaquinone MK-8 a donc été diluée et oxydée en acide phtalique (seule dégradation autorisée par les faibles quantités de radioactivité disponibles), dont l'un des carboxyles doit représenter, dans chacune des deux hypothèses, la radioactivité du CH_2 du groupe énoylpyruvique.

Le rapport $^{14}C/^{3}H$ dans l'acide phtalique est comparé à celui trouvé dans la phénylalanine (isolée et purifiée sous forme de son dérivé DNP) ou mieux à celui des acides phénylacétique et benzoïque issu de l'oxydation de cette phénylalanine.

Pour que le rapport $^{14}C/^{3}H$ soit le reflet exact de l'activité spécifique en ^{14}C et permette ainsi d'interpréter l'expérience, il faut que le tritium ne soit pas randomisé, ce qui est évident si l'on remarque que les activités spécifiques en tritium de l'ubiquinone Q-8 et de la leucine sont quasi-nulles et que celles de la ménaquinone, de l'acide phtalique en dérivant et de la phénylalanine sont identiques.

Ainsi, dans l'expérience utilisant le glucose ^{14}C-1, seul le CH_2-3 de la phénylalanine est marqué et son rapport ^{14}C / ^{3}H peut être comparé directement à celui de l'acide phtalique ; et dans l'expérience avec le glucose ^{14}C-U, la radioactivité ^{14}C est également répartie entre les carbones 1, 2, 3 de la phénylalanine et on peut comparer le tiers de son rapport ^{14}C / ^{3}H, la moitié de celui de l'acide phénylacétique et celui de l'acide benzoïque directement avec le rapport ^{14}C / ^{3}H de l'acide phtalique. Dans tous les cas, ce dernier est bien inférieur à celui de la phénylalanine et de ses produits de dégradation, alors que si l'une des deux hypothèses du schéma 1 était exacte, il devrait être comparable.

.../...

Il en résulte donc que les trois carbones nécessaires à la fermeture du noyau naphtoquinonique ne sont pas ceux du groupement énoyl-pyruvique du chorismate. Si celui-ci est un intermédiaire dans la biosynthèse du noyau naphtoquinonique, ces trois carbones doivent être éliminés à l'une des étapes de cette biosynthèse (cf la formation de l'anthranilate à partir du chorismate et de la glutamine). La radioactivité ^{14}C non négligeable incorporée cependant dans le carbonyle de l'acide phtalique indique une origine proche du pyruvate : peut-être un des acides du cycle de Krebs, mais la randomisation du ^{14}C (leucine par exemple) ne permet pas de conclure sur ce point.

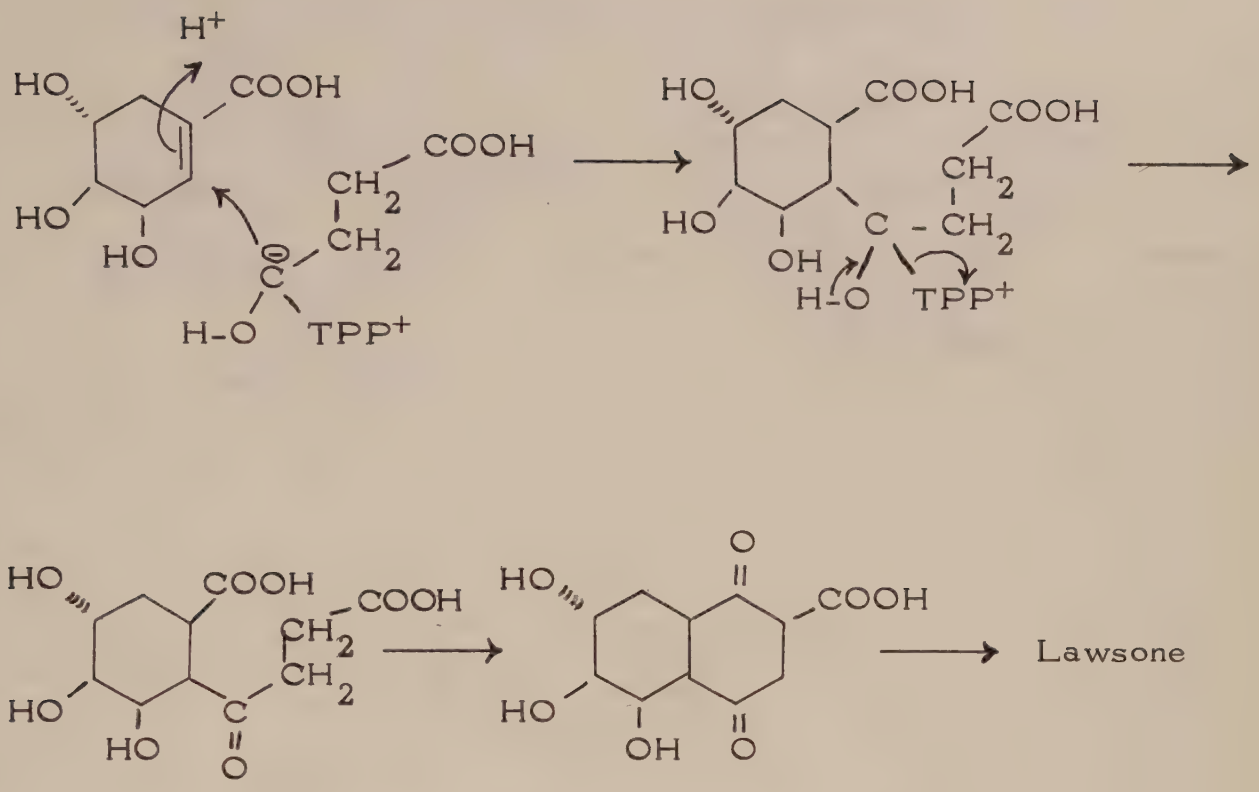
E - Participation du glutamate ; l'acide o-succinoylbenzoïque.

Au moment où nous terminions ce travail, CAMPBELL essayant systématiquement d'incorporer différents acides aminés dans la lawsone (hydroxy-2 naphtoquinone-1,4) de Impatiens balsamina, montrait que l'alanine puis l'acide glutamique étaient incorporés avec un bon rendement (11). Essayant alors d'incorporer des acides glutamiques marqués au ^{14}C en des positions variées, il montrait que seuls les carbones 2, 3, 4 de l'acide glutamique étaient incorporés dans cette naphtoquinone. Depuis, des résultats analogues ont été obtenus en ce qui concerne les ménaquinones de E. coli et M. phlei (13,78).

Se basant sur ces résultats, il faisait l'hypothèse que l'acide glutamique est d'abord transformé en acide α-cétoglutarique qui lui-même est transformé en un intermédiaire de la décarboxylation oxydative en succinylcoenzyme A : le succinylsemialdéhydethiaminepyrophosphate.

Cet aldéhyde activé est un réactif de choix pour attaquer par réaction de MICHAEL la double liaison 1-2 de l'acide shikimique selon le schéma ci-dessous, conduisant à un acide bicyclique trihydroxylé :

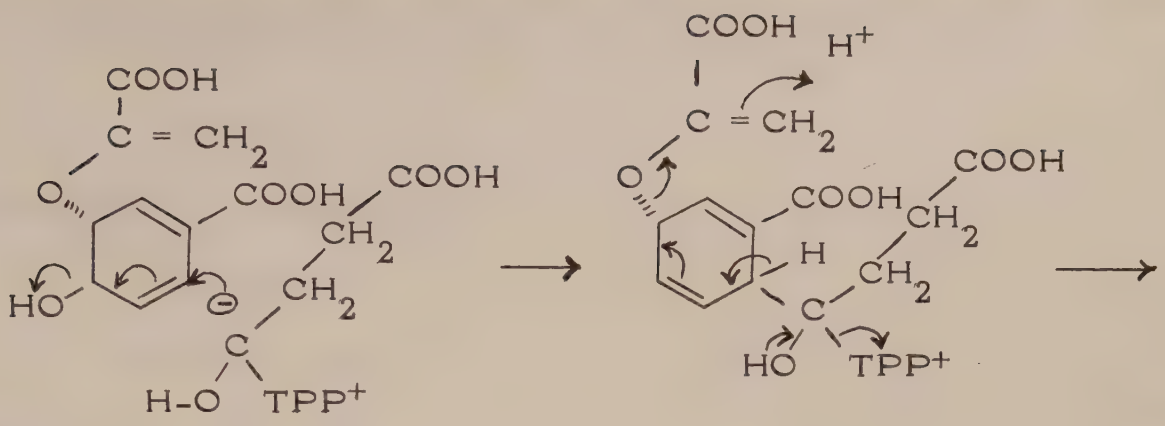
.../...

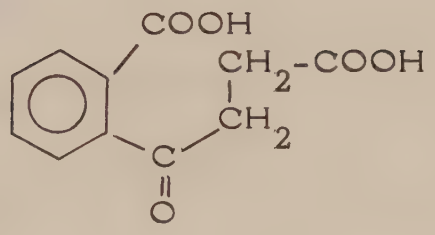


Cette hypothèse, basée sur la participation directe de l'acide shikimique ne coïncidait pas avec notre conviction que l'acide chorismique est en fait aussi un intermédiaire réel et le point de branchement entre la biosynthèse des acides aminés aromatiques et celle des ménaquinones. Par ailleurs, il était impossible d'imaginer une aromatisation simple du composé de CAMPBELL, sans faire intervenir une étape d'oxydo-réduction suivie de déshydratation.

Reprenant donc à notre compte l'intermédiaire succinylsemialdéhyde-thiaminepyrophosphate, mais le faisant réagir plutôt sur l'acide chorismique, nous arrivons à une aromatisation beaucoup plus plausible en acide (carboxy-2' phényl)-4 oxo-4 butyrique (ou acide o-succinoyl-benzoïque, OSB).

.../...



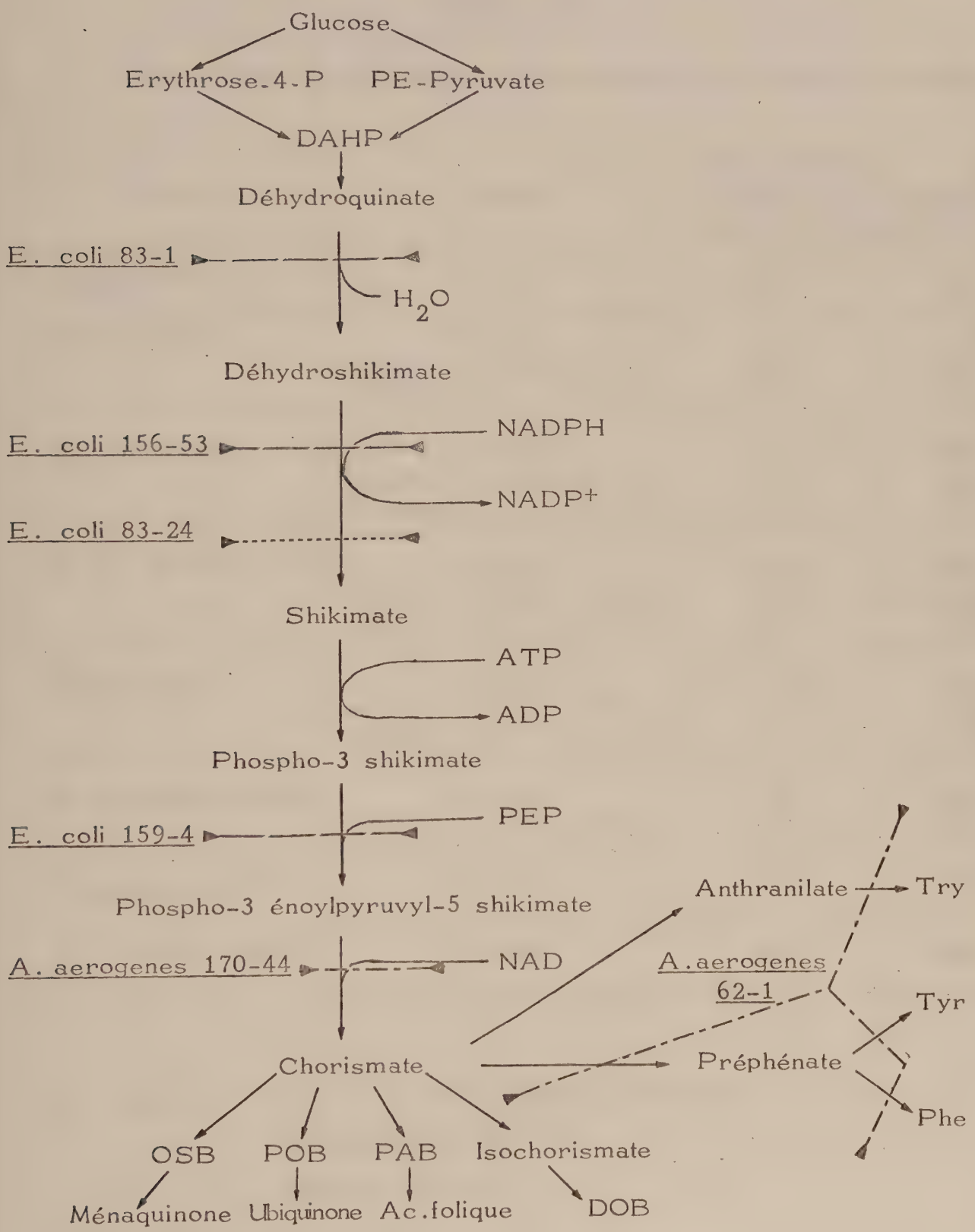


O S B

Ce composé que nous nommerons par la suite O S B a déjà été synthétisé en 1884 par W. ROSER (80). Nous avons donc reproduit cette synthèse et préparé de l'OSB afin d'étudier si ce produit était capable par exemple de restaurer la synthèse de ménaquinone chez les mutants de E. coli et A. aerogenes incapables de synthétiser cette quinone car bloqués avant le chorismate (schéma 2).

.../...

Schéma 2 : Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, des quinones et des vitamines aromatiques chez les bactéries.



Blocage total des mutants de E. coli

Blocage partiel des mutants de E. coli

Blocage total des mutants de A. aerogenes.

Les résultats de cette expérience sont exposés dans le tableau VI.

Tableau VI

Restauration de la synthèse de ménaquinone en présence d'OSB

Mutant	Milieu	MK + DMK (nmoles/g de bacterie sèche)	Q (nmoles/g de bactérie sèche)
E.coli Hfr	minimal	890	780
E.coli 83-1	minimal	< 0,5	58
	minimal + OSB 10^{-4} M	567	111
	minimal + SA 2.10^{-5}M	626	785
E.coli 156-53	minimal	6,2	203
	minimal + OSB 10^{-4} M	576	219
	minimal + SA 2.10^{-5}M	692	729
E.coli 83-24	minimal	512	607
	minimal + OSB 10^{-4} M	526	429
	minimal + SA 2.10^{-5}M	571	676
E.coli 159-4	minimal	< 2	181
	minimal + OBS 10^{-4} M	830	105
	minimal + SA 2.10^{-5}M	4,3	75
A.aerogenes 170-44	minimal	55	665
	minimal + OSB 10^{-4} M	455	448
A.aerogenes 62-1	minimal	310	857
A.aerogenes NCW	minimal	467	1 000

Milieu minimal = VB + L-Tyr, L-Phe, L-Try 10^{-4} M
pAB et DOB 10^{-5} M
Glucose 0,5 %.

.../...

Les résultats de cette expérience sont exposés dans le tableau VI.

Tableau VI

Restauration de la synthèse de ménaquinone en présence d'OSB

Mutant	Milieu	MK + DMK (nmoles/g de bacterie sèche)	Q (nmoles/g de bactérie sèche)
E.coli Hfr	minimal	890	780
E.coli 83-1	minimal	< 0,5	58
	minimal + OSB 10^{-4} M	567	111
	minimal + SA 2.10^{-5}M	626	785
E.coli 156-53	minimal	6,2	203
	minimal + OSB 10^{-4} M	576	219
	minimal + SA 2.10^{-5}M	692	729
E.coli 83-24	minimal	512	607
	minimal + OSB 10^{-4} M	526	429
	minimal + SA 2.10^{-5}M	571	676
E.coli 159-4	minimal	< 2	181
	minimal + OBS 10^{-4} M	830	105
	minimal + SA 2.10^{-5}M	4,3	75
A.aerogenes 170-44	minimal	55	665
	minimal + OSB 10^{-4} M	455	448
A.aerogenes 62-1	minimal	310	857
A.aerogenes NCW	minimal	467	1 000

Milieu minimal = VB + L-Tyr, L-Phe, l-Try 10^{-4} M
pAB et DOB 10^{-5} M
Glucose 0,5 %.

.../...

On voit que dans toutes les souches où un blocage complet avant le shikimate est réalisé (schéma 2), l'OSB 10^{-4} M restaure la synthèse de ménaquinone à un niveau comparable à celui observé en présence de shikimate 2.10^{-5} M ou à celui dans la souche sauvage correspondante.

Chez le mutant 83-24 de E. coli, partiellement bloqué, la synthèse de ménaquinone est normale. Pour le mutant 159-4 de E. coli, bloqué après le shikimate, de même que pour A. aerogenes 170-44, seul l'OSB permet la synthèse de ménaquinone. Contrairement au shikimate, précurseur commun (schéma 2), l'OSB est sans effet sur la biosynthèse de l'ubiquinone. Les faibles variations observées peuvent être interprétées comme le résultat d'une régulation réciproque (18).

Nous avons étudié chez E. coli 83-1 et A. aerogenes 170-44 la quantité de ménaquinone synthétisée en fonction de la concentration en OSB dans le milieu de culture (figure 1). Nous remarquons que OSB 10^{-4} M est largement suffisant pour que ces bactéries forment une quantité normale de ménaquinone. Le phénomène de régulation réciproque de la synthèse des deux quinones est à nouveau apparent sur les courbes (figure 1).

L'OSB a alors été synthétisé marqué au ^{14}C-2',4 et son incorporation testée chez différentes souches bactériennes. Les résultats de ces incorporations figurent dans le tableau VII.

Bien que les pourcentages d'incorporation obtenus ne laissent aucun doute sur la nature de l'incorporation, nous avons vérifié par dégradation que l'OSB s'incorpore sans randomisation de telle sorte que son noyau aromatique devient celui de la ménaquinone.

.../...

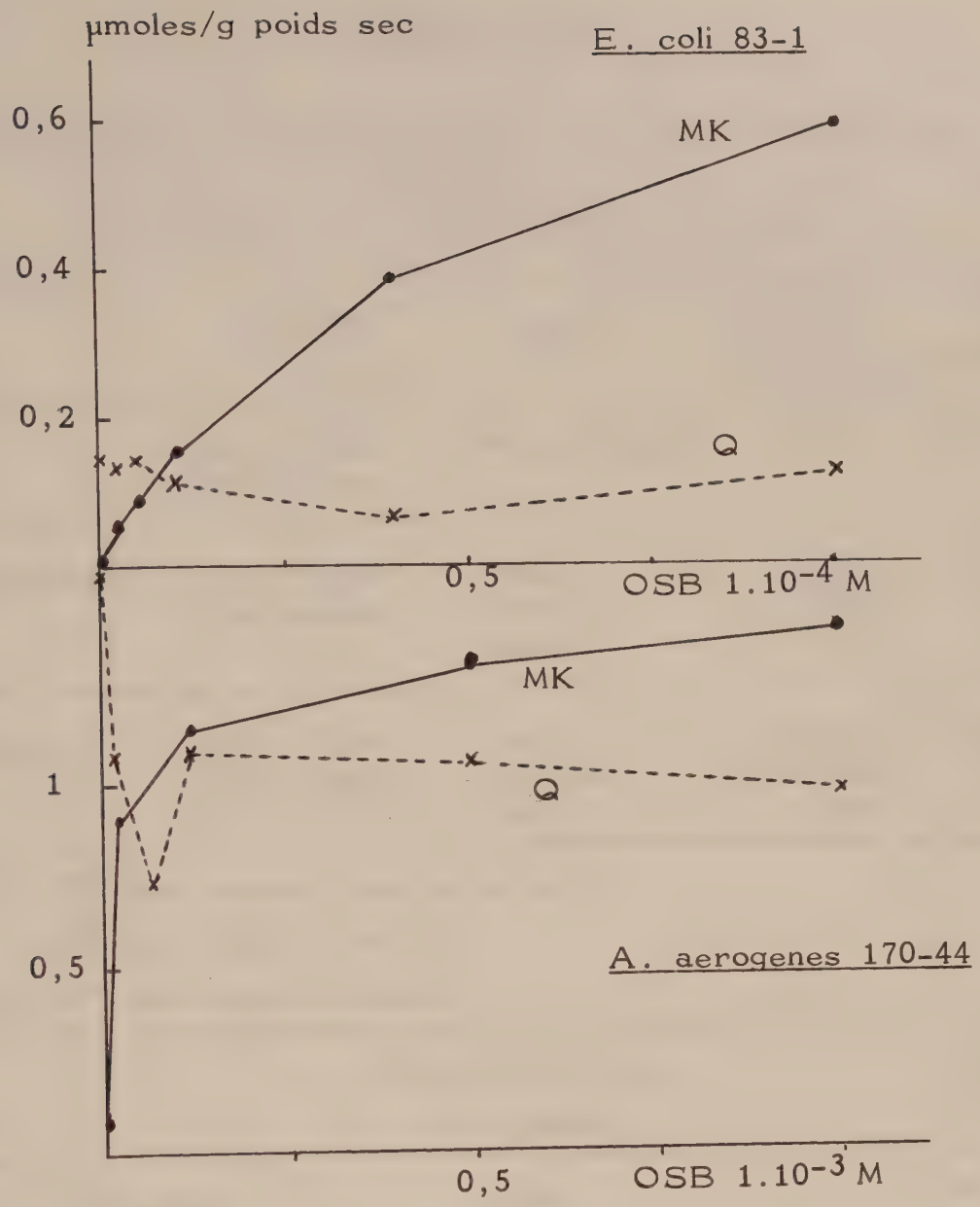


Figure 1

Synthèse des quinones bactériennes
en présence de quantités croissantes d'OSB
chez A.aerogenes 170-44 et E.coli 83-1

Tableau VII

Incorporation de l'OSB ^{14}C-2',4 dans les ménaquinones bactériennes

Dégradation de la ménaquinone de M. phlei

	OSB ^{14}C-2',4	Quinone	Activité spécifique dpm/µmole	% incorp.	Facteur de dilution
M.phlei	2.38x10^{6}dpm [a] (2 µC/µmole)	MK-9 (II H_2)	82.500	70	0.0187
A.aerogenes 62-1	3.57x10^{6}dpm [b] (2 µC/µmole)	MK-8 DMK-8 Q-8	6.200 17.050 37	0,18	0,0014 0,0038
E.coli K-12	8.16x10^{6}dpm [c] (5 µC/µmole)	MK-8 DMK-8 Q-8	880.000 2.040.000 7.100	2,25	0,08 0,185

a 0.13 x 10^6 dpm restant dans le milieu

b 2.8 x 10^6 dpm dans le milieu

c 7.68 x 10^6 dpm dans le milieu

	Activité spécifique dpm/µmole	%
MK-9 (H_2) de M.phlei	1 500	100
Acide phtalique	1 465	97,5
CO_2	660	44

La dihydroménaquinone de M. phlei a été oxydée par la méthode habituelle en acide phtalique, qui contient toute l'activité spécifique, localisée exclusivement dans les carboxyles, comme le montre le tableau VII.

Ces résultats permettent donc de conclure que l'OSB doit être un précurseur direct du noyau naphtoquinonique.

.../...

F - Dilution de l'incorporation du glutamate et du shikimate.

Si l'OSB est un intermédiaire situé en aval de l'acide shikimique et du succinylsemialdéhydethiaminepyrophosphate dérivé de l'acide glutamique, il est logique de penser que l'incorporation de ces acides sera diluée par la présence d'OSB dans le milieu de culture.

Nous avons étudié l'influence de l'OSB sur l'incorporation du shikimate ^{3}H-3 et du glutamate ^{14}C-3,4 dans les quinones de E. coli 83-1. les résultats de ces expériences sont rassemblés dans les tableaux V et VIII.

Tableau VIII

Dilution de l'incorporation du glutamate ^{14}C par l'OSB dans les quinones de E. coli 83-1 *

Précurseur	MK-8 + DMK-8			Q-8			Total
	nmoles	Act.totale dpm	Act. spécif. dpm/nmole	nmoles	Act.totale dpm	Act. spécif. dpm/nmole	nmoles
DL Glu ^{14}C-3,4 20 µCi	212	2 960	13,95	163	295	1,82	375
DL Glu ^{14}C-3,4 20 µCi + OSB 10-4 M	213	1 667	7,79	140	325	2,32	353

* Milieu minimal de VOGEL et BONNER supplémenté en Phe, Tyr, Try et shikimate 10-4 M, glucose 0,5 %.

.../...

L'examen de l'incorporation du shikimate ^{3}H-3 dans la ménaquinone MK-8 en l'absence ou en présence d'OSB (tableau V) indique une forte dilution de l'incorporation (4 à 8 fois) en présence d'OSB. Les résultats précédemment exposés montrent que dans cette expérience pratiquement toute la radioactivité ^{3}H se trouve incorporée dans le noyau naphtoquinonique (cf acide phtalique et Q-8). De plus on peut constater ici un autre exemple de la régulation compensatoire entre les quantités respectives d'ubiquinone et de ménaquinone : la somme des quantités de quinones reste constante (# 150 nmoles) alors qu'en présence d'OSB, la quantité de MK-8 est plus que doublée. La forte dilution observée de l'activité spécifique de la ménaquinone et la constance de la quantité totale de quinones s'expliquent peut-être dans cette expérience par le fait que la quantité totale de shikimate dans le milieu de culture 2.10^{-4} M était limitante en raison de l'absence de phénylalanine et des conditions particulières de culture.

Le tableau VIII montre que l'incorporation dans la ménaquinone 8 du glutamate ^{14}C-3,4 est de même assez fortement diluée (environ deux fois) en présence d'OSB. Une partie de l'incorporation résiduelle doit être attribuée à une randomisation partielle dans la chaîne latérale (13), comme en témoigne la radioactivité non négligeable de l'ubiquinone-8. Aucune régulation compensatoire n'est observée dans ce cas, peut-être en raison d'une quantité de shikimate non limitante dans le milieu (10^{-4} M en présence des trois aminoacides aromatiques).

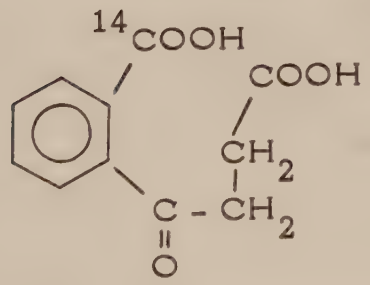
En conclusion, l'OSB dilue nettement l'incorporation dans la ménaquinone de E. coli et du shikimate et du glutamate, tous deux considérés comme des précurseurs certains dans cette biosynthèse. Ceci est un argument pour la participation de l'OSB comme intermédiaire naturel (26).

.../...

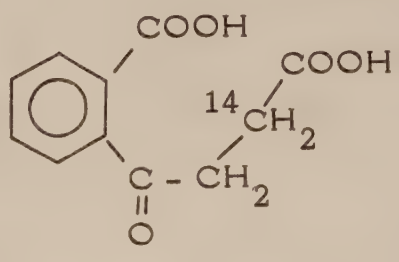
G - Orientation de l'OSB lors de son incorporation dans les ménaquinones.

Ayant établi que l'OSB est un précurseur effectif du noyau naphtoquinonique et sachant que les ménaquinones ne sont pas symétriquement substituées (carbones 1 et 4 ou 2 et 3 non chimiquement équivalents), nous nous sommes demandé si l'incorporation de l'OSB était symétrique ou non, c'est-à-dire si par exemple son carboxyle aromatique 2' était le précurseur d'un seul (et lequel) des carbonyles quinoniques , ou bien s'il s'incorporait indifféremment dans les deux. La réponse à cette question pouvait permettre, comme il sera discuté dans le chapître VI, de postuler ou d'écarter certains intermédiaires entre l'OSB et le noyau naphtoquinonique.

Un des meilleurs moyens de répondre à cette question était de synthétiser de l'OSB asymétriquement marqué. En effet, ce précurseur, comme nous l'avons montré, s'incorpore fortement dans les ménaquinones, et sans aucune randomisation (cf tableau VII). Nous avons donc préparé l'OSB $^{14}COOH$-2' (I) et l'OSB $^{14}CH_2$-2 (II) et étudié leur incorporation dans la ménaquinone de M. phlei qui a ensuite été dégradée carbone par carbone comme indiqué dans le chapître II afin d'en déduire la localisation exacte de la radioactivité.



I

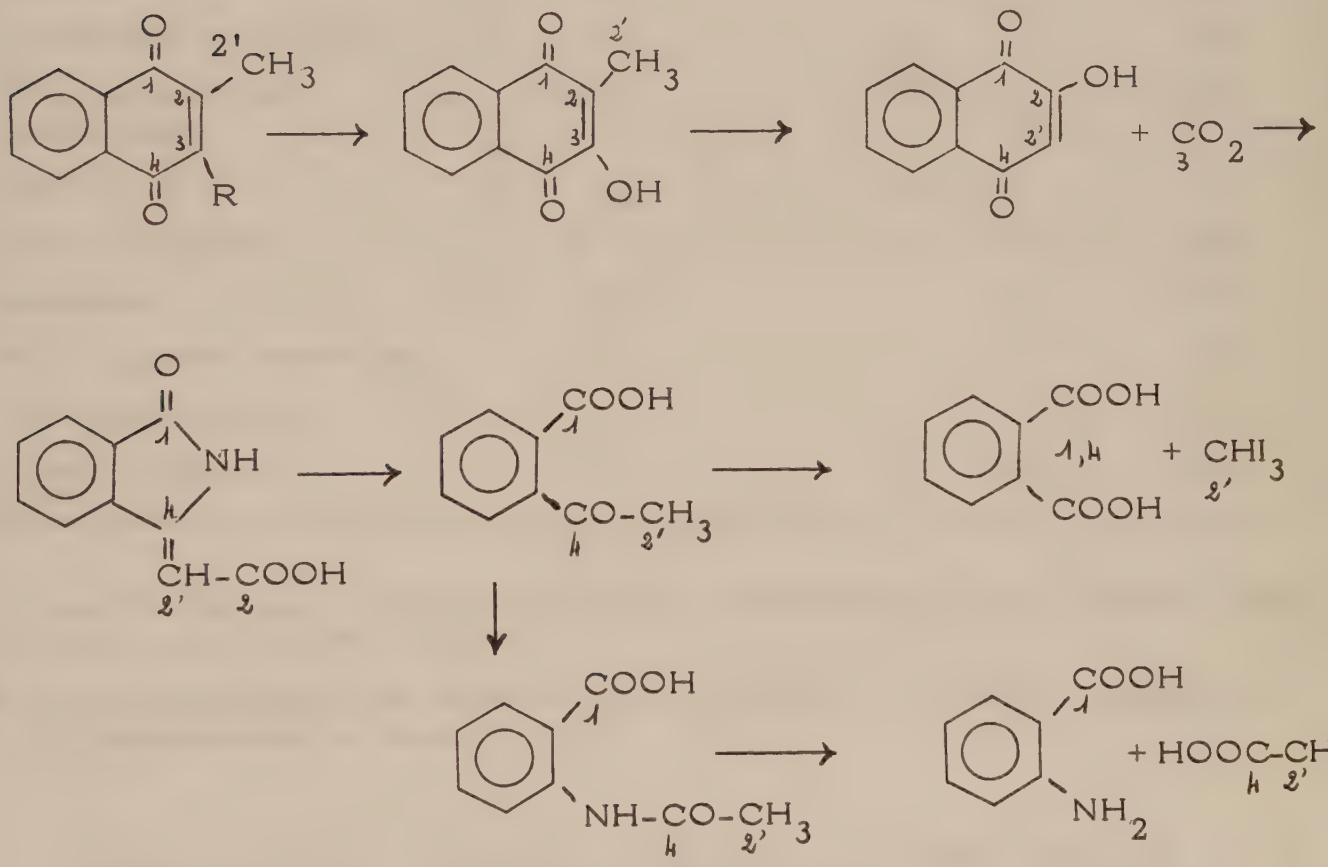


II

.../...

Dégradation de la ménaquinone marquée par l'OSB $^{14}COOH$ -

Après oxydation, l'époxyde de ménaquinone est hydrolysé en phtiocol. Celui-ci est oxydé par la réaction de HOOCKER en lawsone. La lawsone est ensuite dégradée en acide phtalimidèneacétique qui est décarboxylé en acide o-acétophénone carboxylique. Cette molécule est, d'une part transposée par réaction de SCHMIDT en acide N-acétylanthranilique qui est hydrolysé en acétate + anthranilate, d'autre part dégradée en iodoforme + acide phtalique.



Les résultats de cette dégradation figurent dans le tableau IX. Ils montrent que le carboxyle aromatique de l'OSB marque exclusivement le carbone 4 de la ménaquinone (96 - 100 %).

.../...

Tableau IX

Dégradation de la dihydroménaquinone 9 ayant incorporé l'OSB $^{14}COOH$-2

	Atomes de carbone du noyau quinonique conservés	Act. spec. * dpm/µmole	** % rétention
Ménaquinone	1 2 3 4 2'	104.000	100
Phtiocol	1 2 3 4 2'	105.000 → 745	101
Lawsone	1 2 4 2'	750	102
Ac.phtalimidène acétique	1 2 4 2'	732	99
Ac. acétophénone carboxylique	1 4 2'	745 → 235	101
$BaCO_3$	2	0,2	0
Acide phtalique	1 4	230	99
Iodoforme	2'	4	2
Ac. N-acétylanthranilique	1 4 2'	230	99
Ac. anthranilique	1	0,9	0,5
Acide acétique	4 2'	223	96

* Les flèches → indiquent les dilutions successives, avec l'activité spécifique avant et après dilution.

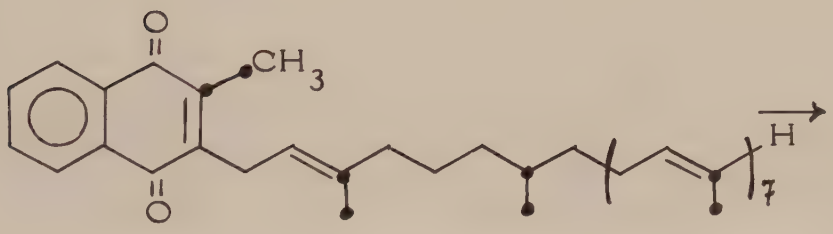
** Les pourcentages de rétention sont rapportés à l'activité spécifique de la ménaquinone de départ = 100.

Dégradation de la ménaquinone marquée par l'OSB $^{14}CH_2$-2 -

La ménaquinone marquée par l'OSB $^{14}CH_2$-2 a été dégradée par deux méthodes (cf chapître II) :

.../...

a) L'oxydation selon KUHN ROTH (83) donne de l'acétate à partir de chacun des carbones porteurs d'un méthyle (C-2 du noyau, C-3',7',11',15'... de la chaîne).



$\longrightarrow$ # 10 $CH_3COOH + CO_2$

En raison de la dilution par les acétates provenant de la chaîne, seule la radioactivité totale de l'acétate est significative, ainsi que celle du gaz carbonique dégagé. Les résultats qui figurent dans le tableau X montrent que, bien que toute la radioactivité ne soit pas récupérée dans le CO_2, l'acétate, donc le carbone 2 du noyau, n'est pas significativement marqué, ce qui laisse penser que toute la radioactivité se trouve en 3.

Tableau X

Dégradation de la ménaquinone marquée par l'OSB $^{14}CH_2$-2 selon KUHN ROTH

	Activité totale	% rétention
MK-9 H_2	400 000	100
Acide acétique 2-2' + méthyls de la chaîne	< 320	0
Ba CO_3	290 000	72,5

.../...

b) La dégradation en phtiocol, qui est soit transformé selon la méthode de HOOCKER en lawsone, soit directement oxydé par l'eau oxygénée alcaline en acide phtalique + acide acétique + gaz carbonique, permet de compter séparément les carbones 2 et 3 (tableau XI).

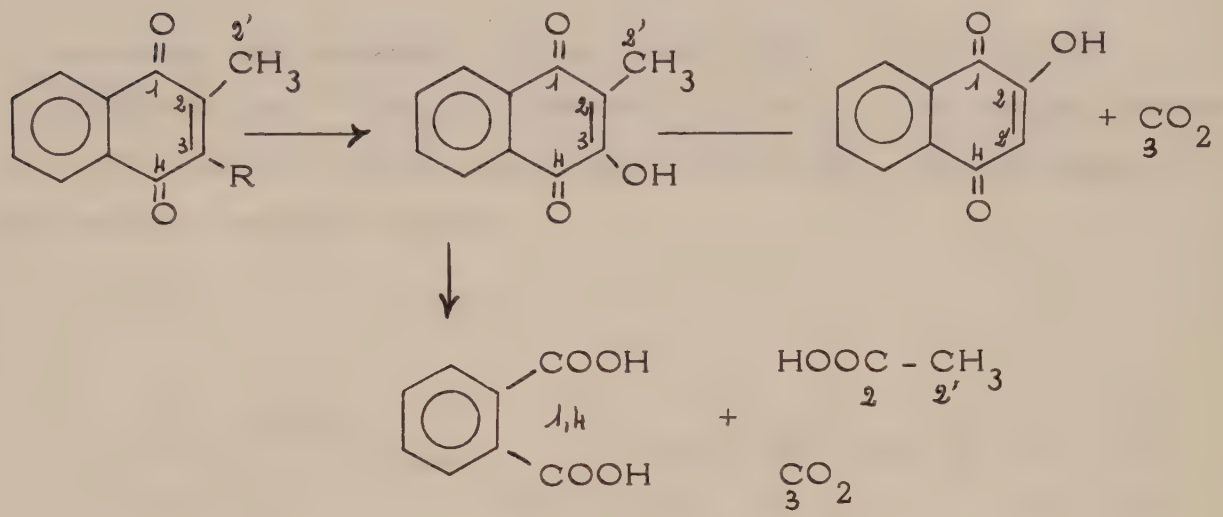


Tableau XI

Dégradation de la ménaquinone marquée par l'OSB $^{14}CH_2$-2

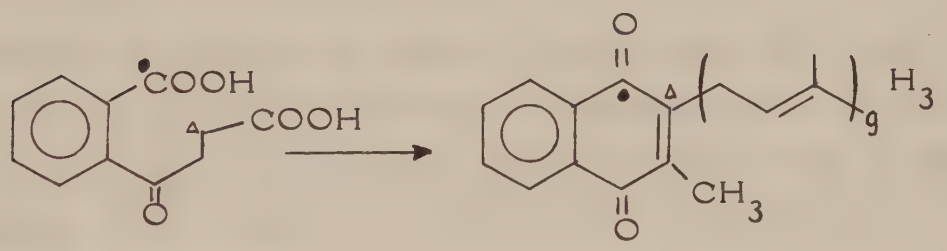
		Activité spécifique dpm/µmole	% rétention
Ménaquinone	1 2 3 4 2'	63 400	100
Phtiocol	1 2 3 4 2'	61 900 $\xrightarrow{*}$ 759	97,7
Lawsone	1 2 4 2'	5	0,7
Ac.phtalique	1 4	0	0
Ac.acétique	2 2'	5	0,7
$BaCO_3$	3	600**	80**

* la flèche $\xrightarrow{}$ indique la dilution, avec l'activité spécifique avant et après dilution.

** le CO_2 recueilli dans cette réaction est toujours dilué par le produit de décarboxylation thermique des peroxyacides inévitablement formés par l'action de l'eau oxygénée sur l'acide phtalique et l'acide acétique (cf tableau XIX). Il en résulte une activité spécifique plus faible et variable selon les conditions dans lesquelles est effectuée la réaction (température).

Les résultats obtenus confirment qu'à partir de l'OSB $^{14}CH_2$-2 la randomisation dans la ménaquinone est très faible, et la radioactivité se trouve exclusivement dans le carbone 3, porteur de la chaîne polyisoprénique.

L'ensemble des résultats obtenus, aussi bien à l'aide d'OSB $^{14}COOH$-2' que $^{14}CH_2$-2 permettent de conclure que l'incorporation de l'OSB dans la dihydroménaquinone MK-9 (H_2) de M. phlei se fait selon le schéma suivant :



CHAPITRE IV

INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS LES NAPHTOQUINONES VEGETALES

A - Incorporation d'acide shikimique ^{3}H-3 (*)

LEISTNER et ZENK ont étudié l'incorporation de l'acide shikimique ^{14}C-1,6 dans la juglone (hydroxy-5 naphtoquinone-1,4) de Juglans regia L et la lawsone (hydroxy-2 naphtoquinone-1,4) de Impatiens balsamina. Puis, utilisant une dégradation en bromopicrine en six étapes, ils ont montré que la cyclisation du noyau quinonique de la juglone s'effectue sur les carbones 1 et 2 du shikimate (65).

Cependant, BIRCH a signalé que la bromopicrine dérivée du dinitrophénol, avant dernier produit de cette dégradation, peut contenir jusqu'à 75 % de bromoforme (4), ce qui met en cause les résultats de la méthode utilisée par ces auteurs. C'est pourquoi nous avons répété ces expériences en incorporant l'acide shikimique ^{3}H-3 (tableau XII) et en dégradant les quinones obtenues comme nous l'avions fait pour les ménaquinones (chapître III - A) (59).

.../...

(*) voir note bas de page 58.

Tableau XII

Incorporation de l'acide D-shikimique ^{3}H-3 dans les quinones végétales

Acide shikimique ^{3}H-3 µ Ci *	Quinone	µmole	dpm/µmole	% incorporation
18	Lawsone	48	1 650	0,2
39	Lawsone	130	7 200	1
18	Juglone	16,2	2 350	0,1
18 **	Juglone	9,3	378	0,01
Ester méthylique 18µCi	Lawsone	69	40	0

* Les quantités de radioactivité administrées sont corrigées pour tenir compte de la présence de 70 - 72 % d'épishikimate dans la préparation de shikimate utilisée (cf chapître I)

** Dans cette expérience, on a utilisé des branches de Juglans cueillies en Septembre et dont le métabolisme est déjà fort ralenti.

a) Dégradation de la lawsone (59)

La lawsone a été oxydée en acide phtalique et celui-ci a été nitré (selon la méthode déjà utilisée pour la ménaquinone) en acides 3 et 4 nitrophtaliques (⊛). Les résultats de ce travail se trouvent résumés dans le tableau XIII.

Tableau XIII

Dégradation de l'acide phtalique dérivé de la lawsone ayant incorporé l'acide shikimique ^{3}H-3

Acide phtalique $^{3}H/^{14}C$	Acide nitro-3 phtalique $^{3}H/^{14}C$	Acide nitro-4 phtalique $^{3}H/^{14}C$	nitro-4 / nitro-3
1,23	0,58	1,14	1,96

.../...

(⊛) L'incorporation de l'acide shikimique ^{3}H-3 dans la lawsone et la dégradation ont été effectuées en collaboration avec Mlle M. LEDUC dans le cadre de sa thèse de Spécialité de Chimie Biologique soutenue le

b) Dégradation de la juglone

La juglone a été bromée selon THOMSON en tribromo-2,3,6 juglone, ou oxydée en acide hydroxy-3 phtalique (cf chapître II).

Le schéma n° 3 met en évidence les différentes hypothèses à envisager pour la transformation de l'acide shikimique en juglone et dans chaque hypothèse les activités spécifiques en tritium à attendre.

Les résultats résumés dans le tableau XIV montrent que la totalité du marquage de la juglone est conservée au cours de la dégradation.

Tableau XIV

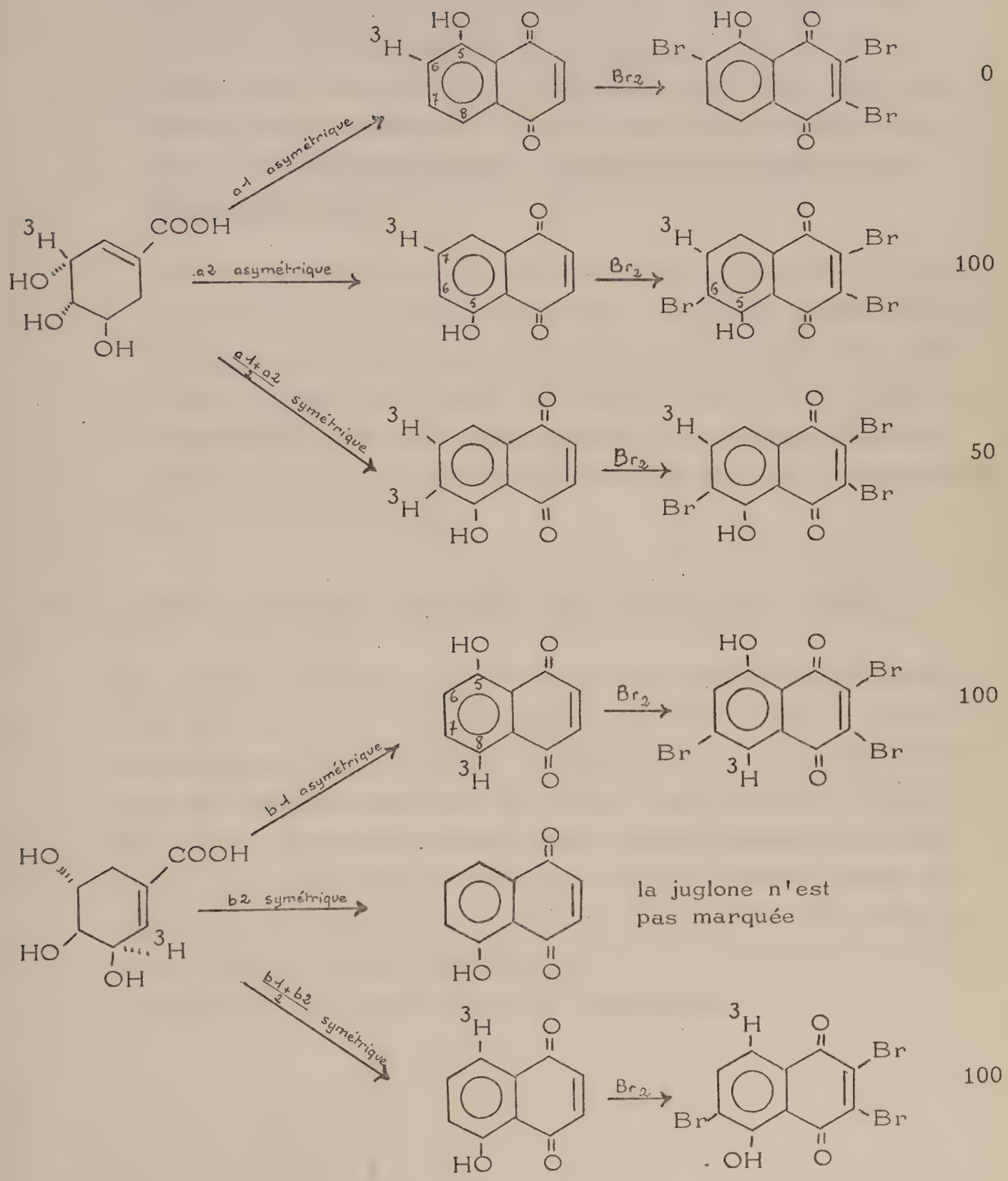
Dégradation de la juglone ayant incorporé l'acide shikimique ^{3}H-3

Juglone dpm/µmole	Ac. hydroxy-3 phtalique dpm/µmole	Tribromojuglone dpm/µmole	% rétention
78		83	106
376	366	358	95

Ces résultats, à savoir rétention de toute la radioactivité après bromuration, comportent plusieurs implications importantes, évidentes dans le schéma n° 3 : il faut que le tritium en position 3 du noyau de l'acide shikimique soit incorporé, soit exclusivement en position 7 du noyau naphtoquinonique de la juglone (hypothèse a 2 du schéma), soit exclusivement en position 8 (hypothèse b 1), soit symétriquement en position 5 et 8 avec élimination du tritium en 5 au cours de l'hydroxylation (hypothèse $\frac{b\,1 + b\,2}{2}$).

.../...

Schéma 3


% 3H
a-1 asymétrique
a2 asymétrique
a-1+a2 / 2 symétrique
b-1 asymétrique
b2 symétrique
b-1+b2 / 2 symétrique
Br2
0
100
50
100
la juglone n'est pas marquée
100

Rappelons que LEISTNER et ZENK ont montré à l'aide d'acide shikimique ^{14}C-U que le carboxyle du shikimate s'incorpore également dans chacun des deux carbonyle de la juglone concluant ainsi à un incorporation symétrique (65). Ceci permet donc d'éliminer les deux hypothèses asymétriques (a 2 et b 1) et montre que l'incorporation du tritium en 3 de l'acide shikimique se fait sur les positions 5 et 8 du noyau naphtoquinonique donc que le cycle naphtoquinonique se ferme sur le carbone 2 de l'acide shikimique.

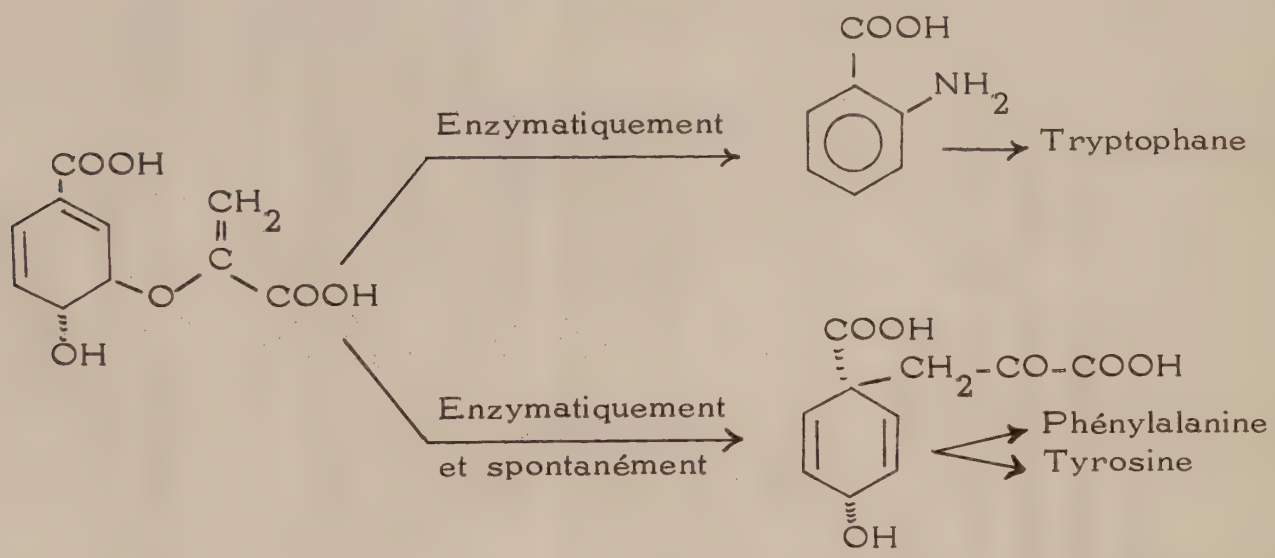
Ce résultat permet de conclure que l'hydroxylation en 5, si elle s'effectue sur la naphtohydroquinone-1,4, comme semble l'indiquer l'incorporation symétrique du shikimate, a lieu sans "NIH shift" (18). En effet, s'il y avait "NIH shift", une partie du tritium en 5 migrerait en 6 lors de l'hydroxylation, et le brome substituant cette position 6, on retrouverait moins de 100 % de la radioactivité dans la tribromojuglone.

B - L'acide chorismique précurseur des naphtoquinones végétales

Au chapître précédent, nous avons vu qu'il était très probable que, chez les bactéries, l'acide chorismique soit précurseur du noyau quinonique, mais l'impossibilité de faire pénétrer l'acide chorismique dans les bactéries empéchait de vérifier cette hypothèse directement. On sait que le système cellulaire des végétaux présente des différences avec celui des bactéries, et on pouvait espérer obtenir une pénétration de l'acide chorismique dans les plantes. C'est ainsi que LEISTNER et ZENK avaient essayé d'incorporer (65) de l'acide chorismique ^{14}C dans la juglone de Juglans regia.

.../...

Dans cette expérience, la juglone n'était pas marquée alors que la phénylalanine et la tyrosine de la plante l'étaient très fortement. Les auteurs avaient aussi vérifié que, dans le milieu d'incubation, le chorismate n'était pas isomérisé spontanément en préphénate, mais ils n'avaient pas cherché à isoler le tryptophane. Or le marquage de cet acide aminé, formé à partir du chorismate par voie uniquement enzymatique, seul aurait été une preuve certaine que l'acide chorismique avait réellement pénétré tel que dans les plantes et sa non-incorporation dans la juglone devenait significative.



Cette lacune nous a incité à répéter cette expérience en utilisant de l'acide chorismique ^{3}H-5 de haute activité spécifique, obtenu enzymatiquement à partir d'acide shikimique ^{3}H-3 à l'aide d'un extrait d'Aerobacter aerogenes 62-1.

Les résultats de ces incorporations, comparés à ceux de LEISTNER et ZENK sont réunis dans le tableau XV.

.../...

Tableau XV

Incorporation de l'acide chorismique ^{3}H-5 dans la leucine, les acides aminés aromatiques et les quinones de Impatiens balsamina (lawsone) et Juglans regia (juglone)

Plante	Précurseur		Quinone		Tyr		Phe		Try		Leu	
			%	dpm/µmole	%	dpm/µmole	%	dpm/µmole	%	dpm/µmole	%	dpm/µmole
J.regia *	CA ^{14}C-G	0,675µCi	0,028	10,6	4,9	3 320	10,9	4 590	-	-	-	-
J.regia **	CA ^{3}H-5	9,5 µCi	0,018	360	-	102 000	20	640 000	0,026	5 200	-	210
I.balsamina ***	CA ^{3}H-5	8,3 µCi	0,9	73 000	-	29 000	6	200 000	0,15	20 000	-	70
I.balsamina ****	SA ^{3}H-3	1 µCi	0,5	2 960	-	-	-	10 600	-	4 300	-	6
	CA ^{3}H-5	1 µCi	0,15	940	-	-	-	14 000	-	1 440	-	5

* Expérience de LEISTNER et ZENK

** Plants de 4 semaines incubés pendant 24 heures

*** Plants de 5 semaines incubés pendant 24 heures

**** Plants de 5 semaines incubés pendant 12 heures.

% Pourcentage d'incorporation.

Ces résultats confirment ceux de LEISTNER et ZENK montrant que l'acide chorismique n'est pas incorporé dans la juglone. Cependant, dans notre expérience, le tryptophane, contrairement à la tyrosine et à la phénylalanine, n'est pratiquement pas radioactif, ce qui montre que l'acide chorismique lui-même n'est pas directement métabolisé par les pousses de Juglans regia.

L'activité élevée de la phénylalanine et de la tyrosine peut s'expliquer par l'incorporation d'acide préphénique formé, soit enzymatiquement, bien que LEISTNER et ZENK dans une expérience analogue aient noté l'absence d'isomérisation spontanée du chorismate, soit enzymatiquement après franchissement par l'acide chorismique d'une première barrière cellulaire, une deuxième devant être franchie pour la transformation en naphtoquinone. L'acide préphénique pourrait seul franchir cette barrière pour donner la phénylalanine et la tyrosine. Par contre, chez Impatiens balsamina, la lawsone ainsi que le tryptophane sont significativement marqués par le chorismate, bien que moins marqués que la phénylalanine ou la tyrosine. Ceci permet de conclure que, au moins chez Impatiens balsamina, l'acide chorismique est incorporé dans le noyau naphtoquinonique.

Outre l'incorporation directe du chorismate, une indication indirecte de son rôle comme intermédiaire pouvait ressortir d'une étude stéréochimique de l'incorporation des hydrogènes du shikimate : en effet, au cours de la transformation du shikimate en chorismate, un proton en 6 est éliminé, et l'étude de cette réaction menée conjointement par HILL et NEWKOME (53 b) et ONDERKA et FLOSS (73) a montré qu'elle était stéréospécifique et conduisait à la perte de l'hydrogène H-6 (pro R) du shikimate.

Il était intéressant de savoir si l'hydrogène H-6 (pro S) du shikimate conservé dans le chorismate l'était aussi dans le noyau naphtoquinonique, ce qui était un argument en faveur de la participation du

.../...

chorismate comme intermédiaire, ou si cet hydrogène H-6 (pro S) était perdu dans le noyau naphtoquinonique, ce qui écartait indiscutablement le chorismate de la voie de biosynthèse.

L'expérience réalisée par SCHARF et ZENK en collaboration avec le groupe de FLOSS (86) a permis de montrer la rétention du proton H-6 (pro S) aussi bien dans la juglone (95 %) que dans la dihydroménaquinone (84 %) de Bacillus megaterium alors que le proton H-6 (pro R) est éliminé (rétention respective de 3 % et 18,6 %). De ces résultats, SCHARF et ZENK concluent que "l'acide chorismique ne peut être exclu comme intermédiaire dans la biosynthèse des vitamines K 2 et de la juglone".

C - Participation du groupement énoylpyruvique à la biosynthèse du noyau

Puisque l'acide chorismique est précurseur du noyau de la lawsone, un raisonnement analogue à celui du chapître précédent (cf p.34 et 35) nous a amené à tester l'incorporation de l'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique dans la lawsone de Impatiens balsamina (tableau XVI) (59).

Au cours de la purification, nous avons eu beaucoup de difficultés à éliminer une impureté marquée qui migre dans de nombreux solvants comme la lawsone, et est aussi oxydable en acide phtalique. Cette impureté pourrait être une isocoumarine, molécule assez courante parmi les constituants des plantes et dérivant de l'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique $^{14}COOH$. En tout état de cause, la lawsone n'est pratiquement pas marquée par cette molécule, ce qui écarte, comme pour les ménaquinones, la participation du groupe énoylpyruvique du chorismate pour la fermeture du cycle naphtoquinonique.

.../...

Tableau XVI

Incorporation d'acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique dans la lawsone

Acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique $^{14}COOH$, µ Ci	Lawsone	
	µmoles	dpm/µmoles
10	11,5	20
10	16,5	13

D - Incorporation de l'OSB dans les naphtoquinones végétales

Nous avons vu au chapître précédent que l'OSB est précurseur des ménaquinones, et que CAMPBELL a montré que le glutamate est à l'origine des trois carbones servant à la fermeture du cycle quinonique de la lawsone (11). Le même raisonnement s'appliquant aux quinones végétales dérivées de l'acide shikimique, nous avons essayé et réussi l'incorporation d'OSB ^{14}C dans la lawsone et la juglone (tableau XVII).

Tableau XVII

Incorporation d'OSB ^{14}C-2',4 dans les naphtoquinones végétales (21)

	Durée de l'incorporation	OSB ^{14}C-2',4 µCi	µCi/µmole	Quinone	µmole	dpm/µmole	% incorporation *
I.balsamina plants de 5 - 6 semaines	24 H	7,5	2	lawsone	168	19 600	20
	48 H	1	5	lawsone	75	17 600	60
J.regia branche(bouquet terminal)	48 H	1	5	juglone	120	1 100	6
plants de 3 sem.	36 H	2	5	juglone	17,2	39 600	15,5

* Les pourcentages d'incorporation sont déduits de l'activité totale incorporée dans la quinone isolée rapportée à la quantité totale de radioactivité effectivement absorbée par la plante.

.../...

Il était nécessaire de vérifier ensuite par dégradation de ces quinones que l'OSB ^{14}C-2',4 s'incorporait bien sans randomisation de telle sorte que le marquage soit localisé exclusivement dans les carbonyles de la naphtoquinone ; c'est effectivement ce que montre le tableau XVIII (21).

Tableau XVIII

Dégradation des quinones ayant incorporé l'OSB ^{14}C-2',4.

		Activité spécifique dpm/µmole	% rétention
Impatiens balsamina	lawsone	625	100
	acide phtalique	621,5	99,5
	carboxyle de l'acide phtalique	290	46,5
Juglans regia	juglone	1 100	100
	ac.hydroxy-3 phtalique	1 165	106
	carboxyle-2 de l'acide hydroxy-3 phtalique	562	51
	ac.hydroxy-3 benzoïque	554	50,3

E - Dilution par l'OSB de l'incorporation du glutamate et du shikimate

L'OSB, précurseur situé en aval de l'acide shikimique et du succinylsemialdéhydethiaminepyrophosphate (voir chapître III), s'il est réellement intermédiaire, doit diluer l'incorporation de ces deux molécules. C'est pourquoi nous avons entrepris une expérience de dilution sur des jeunes plants de Juglans et d'Impatiens dont les résultats sont exposés dans le tableau XIX. Afin d'éviter des erreurs dans la détermination des activités spécifiques, celles-ci ont été obtenues par comptage des triacétoxynaphtalènes dérivés de la lawsone et de la juglone. (En effet le glutamate ^{14}C fortement randomisé gêne la détermination directe de l'activité des quinones).

.../...

Tableau XIX

Dilution de l'incorporation du D-shikimate ^{3}H-3 et du DL-glutamate ^{14}C-3,4 dans les naphtoquinones végétales par l'acide o-succinylbenzoïque

Précurseurs (µCi)		Quinones				
		µmoles	dpm	dpm/µmole	% incorp.	% de l'act. spec initiale
I - Juglans * (24 h)						
Shikimate ^{3}H-3 (10)	juglone	33,3	150 000	4 500	0,68	100
+ glutamate ^{14}C-3,4 (2)			12 600	380	0,57	100
Shikimate ^{3}H-3 (10)						
+ glutamate ^{14}C-3,4 (2)	juglone	19	36 700	1 930	0,167	43
+ OSB (2 µmoles)			2 220	117	0,100	31
Shikimate ^{3}H-3 (10)						
+ glutamate ^{14}C-3,4 (2)	juglone	35,4	32 000	900	0,145	20
+ OSB (20 µmoles)			3 960	112	0,180	29
II - Impatiens ** (48 h)						
Shikimate ^{3}H-3 (10)	lawsone	16	64 800	4 050	0,295	100
+ glutamate ^{14}C-3,4 (1)			11 000	685	1	100
Shikimate ^{3}H-3 (10)	lawsone	17,2	66 500	3 850	0,240	95
+ glutamate ^{14}C-3,4 (1)			2 660	155	0,280	23
+ OSB (1 µmole)						
Shikimate ^{3}H-3 (10)	lawsone	15,8	62 000	3 920	0,280	97
+ glutamate ^{14}C-3,4 (1)			1 830	122	0,175	18
+ OSB (10 µmoles)						
III - Impatiens *** (7 h + 41 h)						
Glutamate ^{14}C-3,4 (10)	lawsone	10,1	83 000	8 250	0,750	100
+ shikimate ^{3}H-3 (10)			24 200	2 400	0,110	100
Glutamate ^{14}C-3,4 (10)	lawsone	11,1	82 500	7 450	0,740	97
+ shikimate ^{3}H-3 (10)			25 700	2 320	0,115	91
+ OSB (1 µmole)						

* plants issus de germination et âgés de trois semaines.

** plantes âgées de six semaines.

*** plantes âgées de huit semaines ; l'incorporation du glutamate a été effectuée seule pendant 7 heures, puis 41 heures en présence du shikimate.

Les résultats du tableau XIX sont différents en ce qui concerne la juglone et la lawsone :

- Dans la juglone, l'incorporation du glutamate et du shikimate sont nettement diminuées quand on administre 2 et 20 µmoles d'OSB en même temps que les précurseurs. Ceci est vrai que l'on se base sur l'activité totale incorporée, ou sur l'activité spécifique de la juglone.

- Par contre, l'incorporation du shikimate dans la lawsone est fort peu affectée par la présence de l'OSB (jusqu'à 10 µmoles). Même dans l'expérience où le shikimate marqué est ajouté 7 heures après l'OSB (afin de pallier des différences de vitesse de pénétration), il n'y a pas de dilution nette de l'incorporation du shikimate (10 % de variation de l'activité spécifique). En ce qui concerne le glutamate, on a obtenu dans une expérience avec des plants assez jeunes une forte dilution de son incorporation dans la lawsone, mais cette dilution n'a pas pu être reproduite avec des plantes plus âgées.

Ces résultats : la dilution évidente dans le cas de la juglone, moins évidente dans celui de la lawsone, mettent à nouveau l'accent sur la différence de perméabilité des cellules de ces deux végétaux vis à vis des petits métabolites : chorismate (tableau XV), shikimate, glutamate et OSB.

F - Essais d'incorporation de glutamate et d'OSB tritiés

Puisque l'OSB et le glutamate sont incorporés dans la juglone et la lawsone, et que ces quinones possèdent des hydrogènes sur les noyaux quinoniques, nous avons voulu savoir si les protons méthyléniques du glutamate ou de l'OSB étaient incorporés dans ces quinones et combien ? Cette expérience devait nous permettre d'éclaircir le mécanisme de fermeture du cycle quinonique en déterminant le nombre et la nature des protons retenus en 2 et 3 du noyau.

.../...

Cependant, avant d'effectuer ces expériences, il était nécessaire de vérifier si, dans les conditions d'incubation et d'isolement utilisées, les protons en 2 et 3 des naphtoquinones isolées n'étaient pas échangeables avec le milieu.

Nous avons aussi étendu cette étude aux hydroquinones correspondantes, conscient du fait que la plupart des schémas de biosynthèse plausibles (cf discussion - chapître VI) impliquaient un ou plusieurs intermédiaires hydroquinoniques, et que les quinones étudiées existent en fait dans les plantes à l'état de glucosides hydroquinoniques (6, 89,94). L'échange a été étudié par incubation dans les milieux dioxane - eau tamponnée en présence de quantités connues d'eau tritiée.

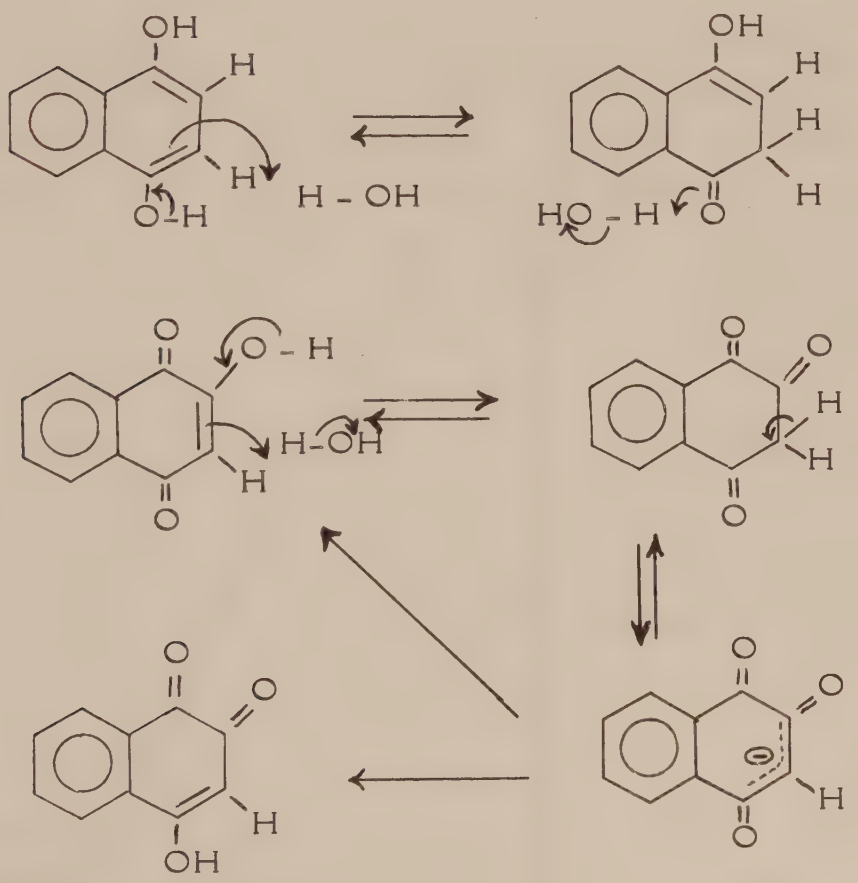
Ni la naphtoquinone-1,4, ni la juglone (voir partie expérimentale) n'incorporent du tritium en milieu acide, neutre ou alcalin (où elles sont dégradées rapidement, moins de 0,05 proton par mole de quinone). Par contre, la lawsone simplement dissoute dans le bicarbonate en présence d'eau tritiée, puis acidifiée, et lavée à l'eau, incorpore une quantité notable de radioactivité (0,9 H^+/mole). Ce traitement par le bicarbonate fait partie de la technique habituelle de purification de la lawsone, qui s'avère donc inadéquate dans ce cas. De même, la préparation du triacétate de lawsone réduite, utilisée couramment dans le processus de purification, effectué en présence d'eau tritiée conduit à une incorporation de 0,9 H^+/mole. C'est pourquoi nous avons adopté lors de l'isolement de la lawsone une technique d'extraction et de purification en milieu acide ou neutre (dans lesquels l'échange est négligeable).

L'échange avec l'eau tritiée de la naphtohydroquinone-1,4 ^{14}C (facilitant la mesure de l'incorporation du tritium par comptage en double marquage) a été étudié à différents pH et pendant des temps différents, dans des tubes scellés sous vide. L'échange est arrêté

.../...

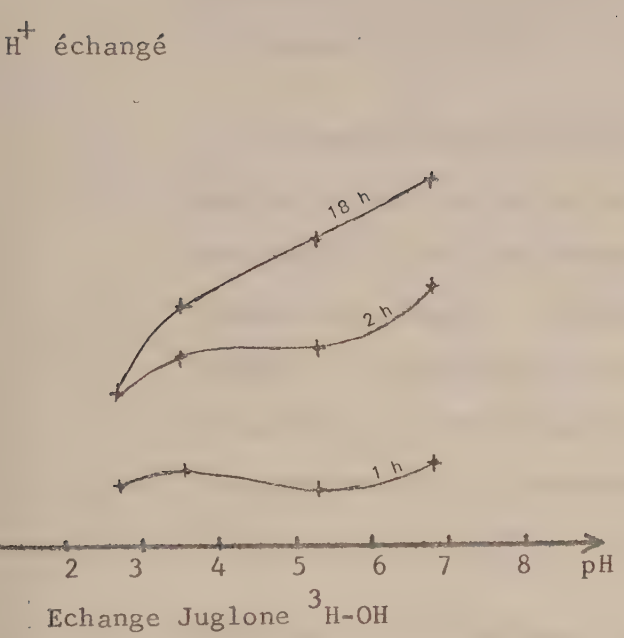
par oxydation en quinone par le sel de Fremy (Nous avons vérifié que cette oxydation en présence d'eau tritiée ne provoque pas d'échange de tritium). La quinone est ensuite purifiée par chromatographie pour la séparer des goudrons formés. Les courbes de la figure 2 montrent que l'échange, faible à pH acide ou neutre, devient important à pH 8 et complet en 18 heures à pH 11,5. La cinétique à pH 8 indique cependant que la réaction est assez lente, et qu'en quelques heures, l'échange reste quasi-négligeable.

Cet échange peut être expliqué par la desénolysation en dihydronaphtoquinones, aussi bien en ce qui concerne la naphtohydroquinone que la lawsone.

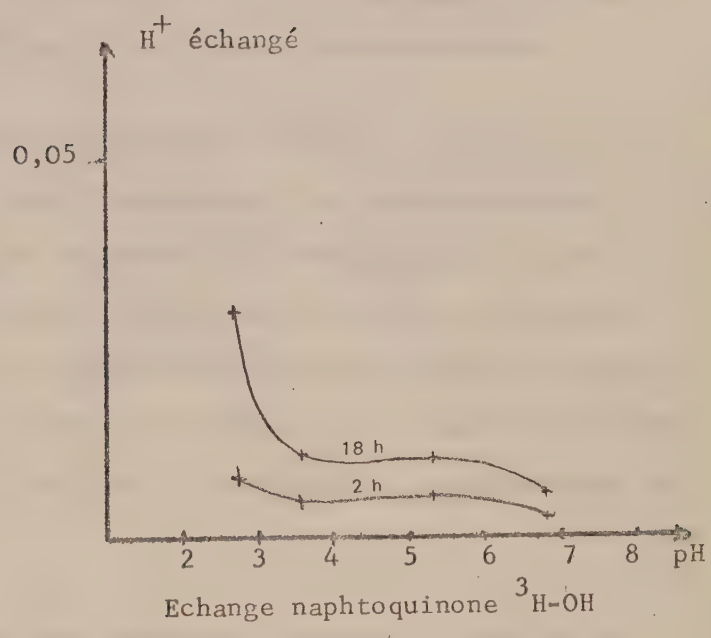


.../...

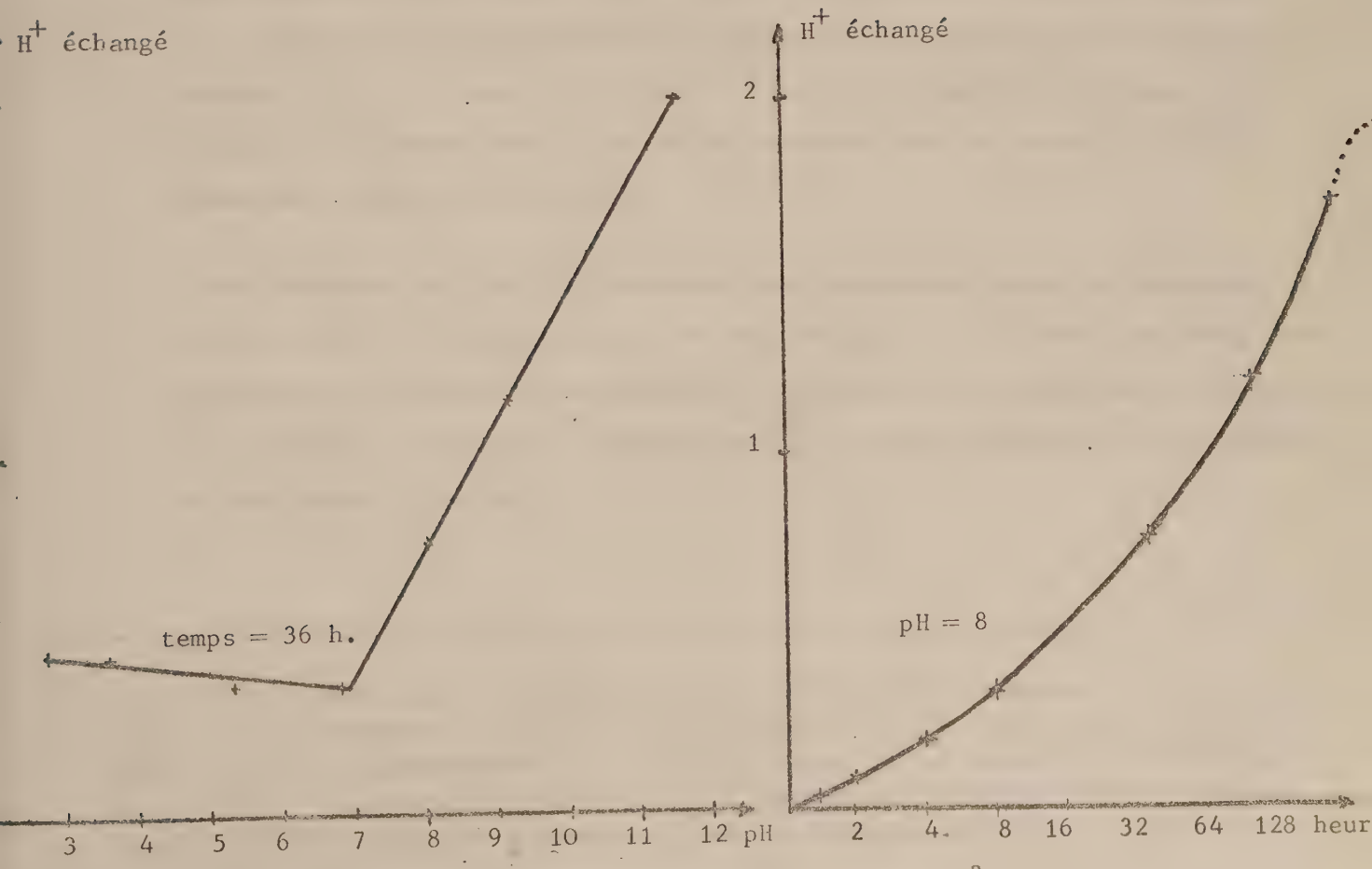
Figure 2



Echange Juglone ^{3}H-OH



Echange naphtoquinone ^{3}H-OH



Echange naphtohydroquinone ^{3}H-OH

Dans la lawsone, la facilité d'échange de l'hydrogène en 3, comme l'acidité de l'hydroxyle (pk # 3,98) (31) est certainement reliée à l'existence de formes mésomères du carbanion intermédiaire.

L'ensemble des résultats d'échange décrits ci-dessus indique qu'il faudra beaucoup de prudence pour interpréter les incorporations effectuées avec des précurseurs capables de marquer les hydrogènes β du noyau naphtoquinonique. En particulier pour la lawsone, malgré la technique particulière d'isolement utilisée, alors que pour la juglone, à condition que les temps d'incubation ne soient pas trop long et les pH d'isolement proches de la neutralité, les échanges ne sont pas à craindre.

Malgré ces limitations, nous avons cependant essayé d'incorporer soit le glutamate ^{3}H-3,4, soit l'OSB ^{3}H-2 marqué sur les deux protons du méthylène α ; ces deux incorporations doivent conduire à des résultats équivalents (*). Dans les deux cas, afin de faciliter les mesures d'incorporation de tritium, on a ajouté soit du DL-glutamate ^{14}C-3,4, soit de l'OSB ^{14}C-2',4, d'activité connue, et calculé l'incorporation d'après la mesure des rapports ^{3}H / ^{14}C dans les quinones purifiées.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans les tableaux XX et XXI. L'incorporation de tritium dans la lawsone est très faible, (même à la première purification) et décroît au cours des purifications successives, bien que l'activité en ^{14}C reste constante. Il en est de même pour la juglone.

.../...

(*) Il est à prévoir que le marquage réel utilisable du glutamate ^{3}H-3,4 est limité aux hydrogènes portés par le carbone 4. En effet, aussi bien au stade de la transamination en α-cétoglutarate qu'au stade de la formation de l'OSB, les deux hydrogènes en 3 deviennent voisins d'un carbonyle et sont par conséquent énolisables donc échangeables (voir chapitre I).

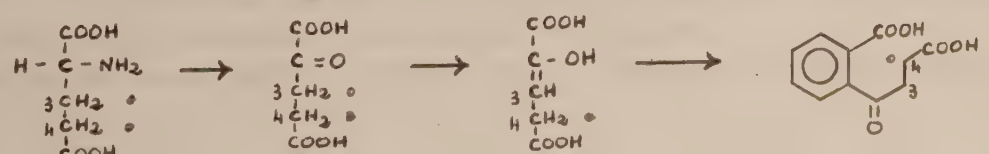


Tableau XX

Incorporation de L-glutamate ^{3}H-3,4 et DL-glutamate ^{14}C-3,4 dans les naphtoquinones végétales

	L-Glu ^{3}H * / L-Glu ^{14}C		Quinone µmole	Quinone dpm ^{14}C/µmole	% incorporation	$^{3}H/^{14}C$	nb protons incorporés /mole
Impatiens	9,15 **	Lawsone	103	690 (1ère purific.)	2,6	0,30	0,15
				710 (2e ")		0,14	0,07
				715 (3e ")		0,08	0,04
				710 (4e ")		0,07	0,03
Juglans	39,0 ***	Juglone	62	224 (1ère purific.)	0,63	0,80	0,08
				224 (2e ")		0,70	0,075
				224 (3e ")		0,47	0,035

* Ce rapport est mesuré par détermination du rapport $^{3}H/^{14}C$ dans le mélange de glutamate L ^{3}H / DL ^{14}C et en multipliant par 2. Ce rapport correspond à 4 protons par molécule.

** Plant âgé de 6 semaines incubé pendant 16 heures.

*** Plant obtenu par germination et âgé de 15 jours, incubé pendant 48 heures.

Tableau XXI

Incorporation d'OSB ^{3}H-2 , ^{14}C-2' dans les naphtoquinones végétales

	OSB $^{3}H/^{14}C$ * / $^{3}H/^{14}C$		Quinone µmole	Quinone dpm/µmole ^{14}C	% incorporation	$^{3}H/^{14}C$	nombre protons incorporés
Impatiens	6,5 **	Lawsone	6,7	16 500	9,9	0,04	0,0008
						0,02	0,0005
Juglans	8,65 ***	Juglone	21,6	51 000	50	0,04	0,0005

* Activité spécifique de l'OSB ^{14}C = 5 µCi/µmole, activité ^{3}H = 1/2 de l'activité de la dilactone après traitement par NaOH N (cf chapitre I).

** Plants âgés de 8 semaines, incubation 48 heures.

*** Plants issus de germination et âgés de 3 semaines, incubation 48 heures.

En raison des limitations indiquées ci-dessus et du fait qu'un seul proton reste échangeable dans la lawsone, ce qui fait intervenir des considérations de symétrie lors de l'incorporation, le résultat négatif est difficilement interprétable. Par contre, en ce qui concerne la juglone, l'absence totale d'incorporation dans les hydrogènes 2 et 3 conservés, aussi bien à partir du glutamate qu'à partir de l'OSB tritié, est parfaitement significative (dans ce cas, l'incorporation est symétrique - voir chapître IV, A) et implique la perte totale des deux hydrogènes portés par le carbone 2 de l'OSB au cours de la fermeture du cycle quinonique, ou de réactions ultérieures.

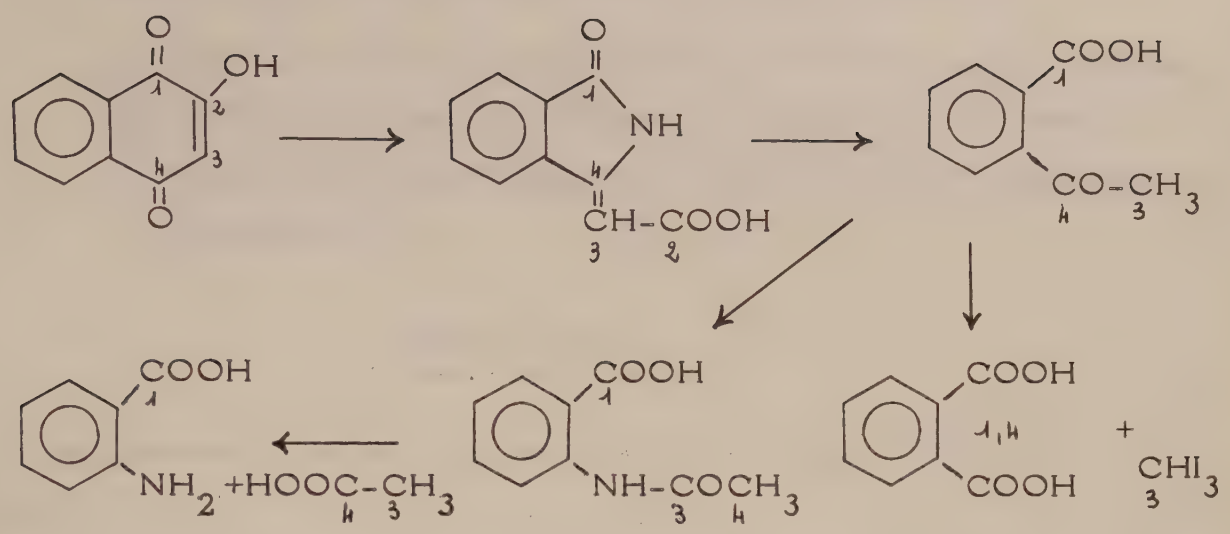
G - Orientation de l'OSB lors de son incorporation dans les quinones végétales.

Comme nous l'avons vu au chapître précédent pour les ménaquinones, il était aussi très intéressant de savoir si l'incorporation de l'OSB dans les naphtoquinones végétales était symétrique, et sinon de déterminer dans quel sens l'OSB s'incorpore dans ces quinones. C'est pourquoi nous avons incorporé de l'OSB ^{14}COOH-2' et $^{14}CH_2$-2 dans la lawsone, ainsi que l'OSB ^{14}COOH-2' dans la juglone.

1°) Incorporation de l'OSB ^{14}COOH-2' dans la lawsone :

La dégradation déjà utilisée précédemment a été employée. La lawsone diluée et cristallisée à activité spécifique constante est transformée par réaction de SCHMIDT en acide phtalimidène-acétique, qui est décarboxylé en acide o-acétophénone carboxylique (hydroxy-3 méthyl-3 phtalide). Celui-ci est transformé en acide N-acétylanthranilique, ou dégradé en acide phtalique et iodoforme.

.../...



Les résultats de cette dégradation figurent dans le tableau XXII et montrent que le carbone 1 de la lawsone est seul marqué (plus de 95 % du marquage) par l'OSB ^{14}COOH-2'.

Tableau XXII

Dégradation de la lawsone marquée par l'OSB ^{14}COOH-2'

	Carbones conservés	Activité spécif. dpm/µmole	% rétention
Lawsone (après dilution)	1 2 3 4	1 190	100
Ac. phtalimidèneacétique	1 2 3 4	1 170	98
Ac. acétophénone carboxylique	1 3 4	1 150	96
$BaCO_3$	2	1,5	0,1
Acide phtalique	1 4	1 110	92
Iodoforme	3	0,4	0
Ac. N-acétylanthranilique	1 3 4	1 160	97
Acide anthranilique	1	1 135	94
Acide acétique	3 4	6	0,5

.../...

2°) Incorporation de l'OSB $^{14}CH_2$-2 dans la lawsone :

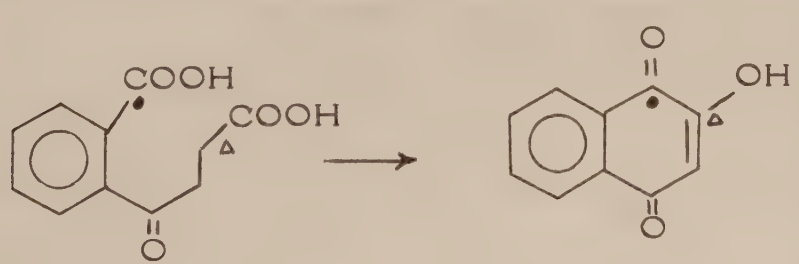
La même méthode de dégradation a été utilisée ; les résultats figurent dans le tableau XXIII et montrent que le carbone 2 de la lawsone est seul marqué par l'OSB $^{14}CH_2$-2 (plus de 98 % du marquage).

Tableau XXIII

Dégradation de la lawsone marquée par l'OSB $^{14}CH_2$-2

Molécule	Carbones conservés	Activité spécif. dpm/µmole	% rétention
Lawsone	1 2 3 4	937	100
Acide phtalimidèneacétique	1 2 3 4	935	100
Ac.acétophénone carboxylique	1 3 4	4,8	0,5
$BaCO_3$	2	920	98
Acide phtalique	1 4	1,7	0,1
CHI_3	3	0,4	0,05

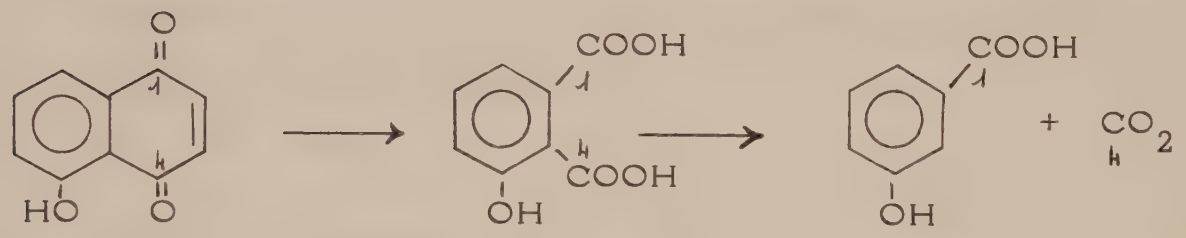
De l'ensemble de ces résultats, il est évident que l'OSB s'incorpore de manière non symétrique de telle sorte que le carboxyle aromatique devient le carbone 1 de la lawsone, et le méthylène α le carbone porteur de l'hydroxyle.



.../...

3°) Incorporation dans la juglone :

La seule méthode de dégradation facilement accessible est l'oxydation en acide hydroxy-3 phtalique, puis la décarboxylation en acide hydroxy-3 benzoïque. Elle présente l'avantage de permettre facilement le comptage séparé des carbones 1 et 4. C'est pourquoi nous avons seulement incorporé l'OSB ^{14}COOH-2'.



Les résultats de l'incorporation et de la dégradation de la juglone sont décrits dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV

Incorporation de l'OSB ^{14}COOH dans la juglone et dégradation

	OSB	Juglone		
	µCi	µmole	dpm/µmole	% incorporation
*	3	210	785	2,6

	Carbones conservés	Activité spécif. dpm/µmole	% rétention
Juglone	1 2 3 4	785	100
Ac.hydroxy-3 phtalique	1 4	785 → 175	100
Ac.hydroxy-3 benzoïque	1	84	48
$BaCO_3$	4	91	52

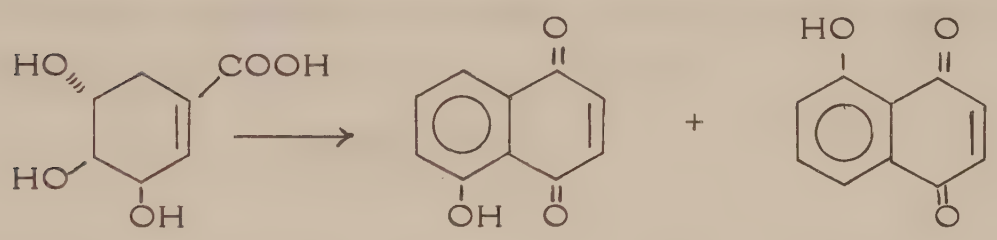
* Incubation pendant 48 heures de 30 grammes de branches de Juglans cueillies en Mai.

→ La flèche indique une dilution.

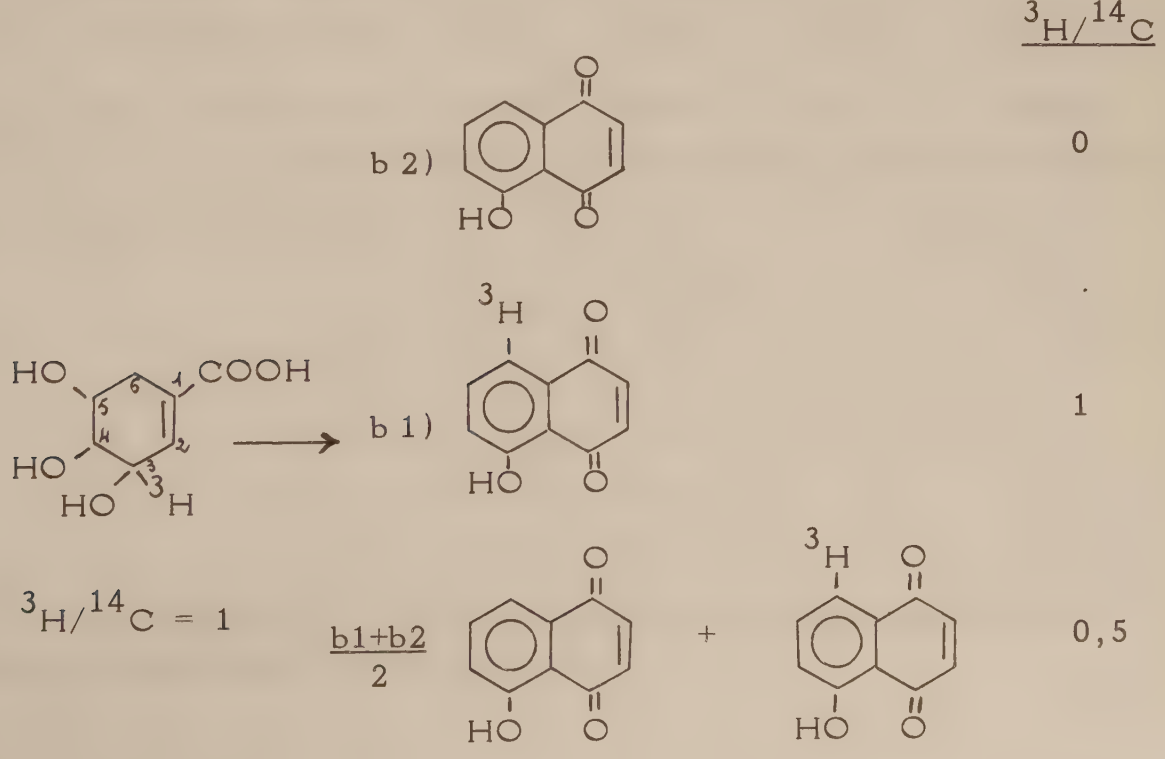
.../...

Ces résultats montrent que le carboxyle aromatique de l'OSB est incorporé de façon égale dans les deux carboxyles de la juglone, donc qu'il existe dans ce cas, au cours de la biosynthèse entre l'OSB et la juglone, un intermédiaire symétrique pour lequel il y a équivalence entre les deux carbones 1 et 4 du noyau naphtalénique.

Une autre méthode a encore été employée pour montrer cette symétrie ; nous avons vu que l'acide shikimique s'incorporait suivant le schéma ci-dessous :



Si nous étudions l'incorporation d'acide shikimique doublement marqué, par exemple ^{3}H-3 / ^{14}C-U, et si nous suivons le rapport ^{3}H / ^{14}C dans la juglone, il y a théoriquement trois possibilités (chapître IV - A cf schéma 3 p. 60)



.../...

Si l'incorporation se fait de telle sorte que les deux carboxyles ne soient, au cours de la biosynthèse, jamais équivalents, la rétention du tritium est soit totale, soit nulle. Par contre, s'il existe un intermédiaire symétrique (*), la rétention du tritium est de 50 %. Nous avons donc incorporé l'acide shikimique ^{3}H-3 en mélange avec de l'acide shikimique ^{14}C-U. Les résultats obtenus figurent dans le tableau XXV ; nous y avons aussi fait figurer pour comparaison, ceux obtenus parallèlement par SCHARF et ZENK (86) avec l'acide shikimique ^{3}H-6 (R) et ^{3}H-6 (S) en mélange avec de l'acide shikimique $^{14}COOH$: 50 % seulement du tritium de l'acide shikimique ^{3}H-6 (S) ou ^{3}H-3 sont conservés, le tritium ^{3}H-6 (R) est lui éliminé au cours de la transformation en chorismate.

Tableau XXV

Incorporation du shikimate ^{3}H-3 ou ^{3}H-6 dans la juglone

Précurseur	$^{3}H/^{14}C$	Juglone		Juglone $^{3}H/^{14}C$ / SA $^{3}H/^{14}C$
		% incorp.	$^{3}H/^{14}C$	
SA ^{3}H-3, SA ^{14}C-U	6,95	0,29	3,46	0,498
SA ^{3}H-6 (R), SA $^{14}COOH$ **	5,27	0,27	0,08	0,015
SA ^{3}H-6 (S), SA $^{14}COOH$ **	5,77	0,52	2,75	0,476

** Résultats de SCHARF et ZENK.

.../...

(*) Compte tenu de l'absence de "N I H shift" lors de l'hydroxylation en 5 précédemment démontrée (chapître IV - A).

Cette conclusion est entièrement en accord avec les résultats précédemment obtenus [tableau XXIV et LEISTNER et ZENK (65)] et montre qu'à un stade de la biosynthèse de la juglone, il existe un intermédiaire dont les carbones précurseurs des C 1 et C 4 quinoniques sont équivalents, tel par exemple la naphtohydroquinone-1,4.

Cette conclusion est en opposition flagrante avec celle qui concerne la lawsone, puisqu'on peut affirmer que pour cette dernière, aucun intermédiaire symétrique n'existe après l'OSB.

H - Précurseurs naphtoquinoniques de la lawsone.

La naphtoquinone-1,4 a été considérée comme un précurseur de la juglone et de la lawsone, dans lesquelles elle est incorporée (65). Cependant, si cette hypothèse semble possible pour la juglone, elle est exclue pour la lawsone. Ainsi, le tableau XVI montre que la naphtoquinone-1,4 ^{14}C est incorporée nettement dans la lawsone (3,6 % en 48 heures) d'Impatiens balsamina ; mais cette incorporation est bien plus faible que celle de l'OSB (16 fois m[illegible] dans les mêmes conditions. On peut donc penser que la plante peut hydroxyler la naphtoquinone-1,4 qui lui est administrée, mais que cette réaction ne fait pas partie de la voie normale de biosynthèse, dans laquelle l'OSB est incorporé dissymétriquement. Elle serait plutôt due à un processus de détoxication par hydroxylation, classique chez les végétaux supérieurs.

Un candidat au rôle d'intermédiaire, très plausible pour expliquer cette incorporation dissymétrique, serait l'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque produit par la cyclisation éventuelle de l'OSB par une réaction de CLAISEN ; malheureusement, ce produit est très instable et nous n'avons pu le synthétiser marqué. Par contre, le produit froid a été préparé et utilisé dans une expérience de dilution de l'incorporation d'OSB ^{14}C-2',4 (tableau XXVI).

.../...

Si on se base sur l'activité spécifique de la lawsone, il n'y a aucune dilution de l'incorporation. Par contre, si l'on se base sur le rapport de l'activité totale incorporée à l'activité totale administrée, il y a une forte diminution de l'incorporation (32 % au lieu de 60 %). Malheureusement, il est difficile de savoir si cette réduction de la quantité totale de lawsone est due à une perte au cours de la purification ou à une variation individuelle dans les lots de plantes utilisées.

La même expérience de dilution avec le dihydroxy-1,4 naphtalate d'éthyle, ester de l'acide qui, après décarboxylation, donne l'acide dihydroxynaphtoïque, conduit au même résultat, difficile à interpréter : ce composé ne peut être un précurseur direct sauf s'il est saponifié et décarboxylé dans la plante, ce qui semble peu probable.

C'est pourquoi nous ne pouvons pas conclure à une dilution significative de l'incorporation de l'OSB ^{14}C par l'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque.

Dans le même tableau, nous remarquons que l'OSB dilactone est moins bien incorporé que l'acide, tandis que son produit de réduction, l'acide (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy-4 butyrique n'est pas du tout incorporé dans la lawsone. Ce dernier composé aurait pu être un dérivé de réduction biologique de l'OSB et un précurseur éventuel des naphtoquinones végétales. Ce n'est pas le cas.

.../...

Tableau XXVI

Incorporation d'OSB et de précurseurs naphtaléniques dans la lawsone de Impatiens balsamina *

	µ Ci	µmoles	dpm/µmole	**	% incorpor.
Naphtoquinone-1,4	1	65	1 080		3,6
OSB ^{14}C-2',4	0,85	63,7	17 600	(100) **	60
OSB ^{14}C-2',4 + dihydroxy-1,4 naphtalate d'éthyle (10 µmoles)	1	50	17 850	85	40
OSB ^{14}C-2',4 + ac.dihydroxy-1,4 naphtoïque (10 µmoles)	1	40	16 200	85	32
OSB ^{14}C-2',4 dilactone	0,75	61	5 800	35	20
Ac. (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy-4 butyrique ^{14}C-2',4	0,80	65	0	0	0

* 810 grammes plants âgés de 6 semaines incubés 48 heures.

** Activité spécifique rapportée à la quantité de radioactivité administrée et ramenée a 100.

CHAPITRE V

INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS LES ANTHRAQUINONES VEGETALES

LEISTNER et ZENK ont, les premiers, montré que l'acide shikimique s'incorpore dans la partie naphtoquinonique des anthraquinones de Rubia tinctorum (62) : alizarine, purpurine, pseudopurpurine et rubiadine. Il est de même probable que le cycle anthraquinonique dans ce cas, dérive d'un cycle naphtoquinonique préformé après addition d'un résidu isoprénoïde qui serait à l'origine du cycle C (10,64,85).

C'est pourquoi, ayant à notre disposition un précurseur du noyau naphtoquinonique en aval de l'acide shikimique, nous avons essayé de l'incorporer dans ces quinones.

Par ailleurs, il existait dans la littérature des résultats divergents quant à l'incorporation de l'acide shikimique dans certaines quinones qui pouvaient aussi dériver de la cyclisation d'une chaîne polyacétique (66,71). C'est pourquoi nous avons systématiquement essayé l'incorporation de l'OSB ^{14}C dans certaines anthraquinones et l'avons, dans certains cas, comparée à celle du shikimate ^{3}H-3 et de l'acétate $^{14}CH_3$ (tableau XXVII).

.../...

Tableau XXVII

Incorporation de l'OSB ^{14}C de l'acétate et du shikimate dans les anthraquinones végétales

Plante	Précurseur		Quinone	Activ. spéc. dpm/µmole	% incorpor.
Rubia peregrina	OSB ^{14}C-2',4	4 µCi	pseudopurpurine	1 160	1
			rubiadine	398	1
Rubia tinctorum	OSB $^{14}COOH$-2'	9 µCi	alizarine	1 000	3
			lucidine	1 200	3
Digitalis purpurea	OSB ^{14}C-2',4	2 µCi	phomarine	80 200	0,9
	OSB $^{14}COOH$-2'	2 µCi	méthoxyméthyl-anthraquinone	?	> 1
	acétate $^{14}CH_3$	10 µCi	phomarine	7 250	0,04
Rheum palmatum	OSB $^{14}COOH$-2'	2 µCi	chysophanol	10	0,01
	SA ^{3}H-3	10 µCi		11	0,002
	acétate $^{14}CH_3$	10 µCi		168	0,05

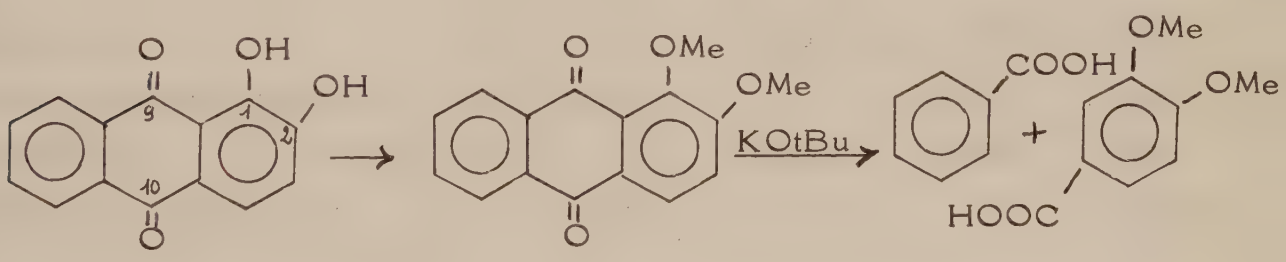
On note bien parmi toutes les plantes testées la différence d'incorporation de l'OSB et de l'acétate dans leurs quinones. Cette incorporation confirme l'origine naphtoquinonique du noyau des quinones des Rubiacées : alizarine, rubiadine, lucidine, pseudopurpurine, etc... et l'origine polyacétique du noyau du chysophanol de Rheum palmatum (60) un moment contestée (71). Nous avons vérifié pour la pseudopurpurine de Rubia peregrina que toute la radioactivité incorporée à partir d'OSB ^{14}C-2',4 était bien localisée dans les carbonyles, ce qui montre que l'OSB n'est pas randomisé (21).

.../...

La phomarine de Digitalis purpurea est une anthraquinone dont le noyau A est hydroxylé, ce qui à priori constitue généralement un indice pour la voie polyacétique (94,100). Cependant, elle incorpore l'OSB 22 fois mieux que l'acétate $^{14}CH_3$. C'est le premier exemple de quinone de ce type biosynthétisé par la voie du shikimate, mais ce ne doit pas être le seul puisqu'il existe chez les rubiacées des anthraquinones, analogues de l'alizarine, et hydroxylées dans le noyau A (morindone par exemple).

Orientation de l'OSB lors de son incorporation dans les anthraquinones de Rubia -

Nous avons incorporé l'OSB $^{14}COOH$, seul utilisable en raison de la méthode de dégradation choisie, dans l'alizarine et la lucidine de Rubia tinctorum . L'incorporation totale dans l'ensemble des quinones dépasse 10 %. L'alizarine et la lucidine ont été isolées puis dégradées. L'alizarine a été méthylée par le diméthylsulfate en diméthoxy-2 anthraquinone, qui a été hydrolysée en acide vératrique et acide benzoïque.



La lucidine a été oxydée en munjistine, laquelle a été décarboxylée en xanthopurpurine, celle-ci méthylée en diméthoxy-1,3 anthraquinone et hydrolysée en acide benzoique et acide diméthoxy-3,5 benzoïque.

.../...

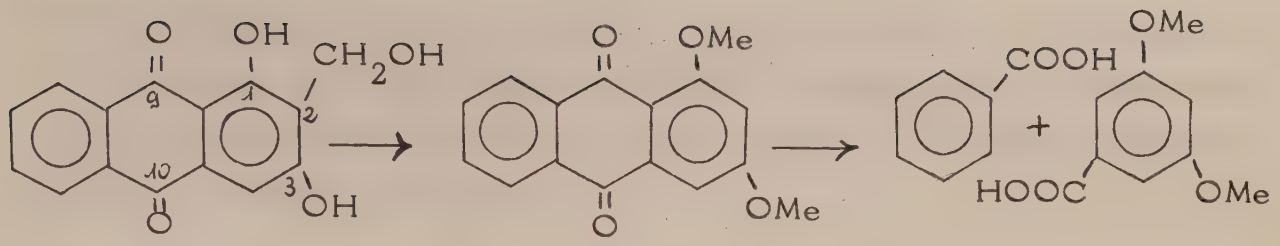


Tableau XXVIII

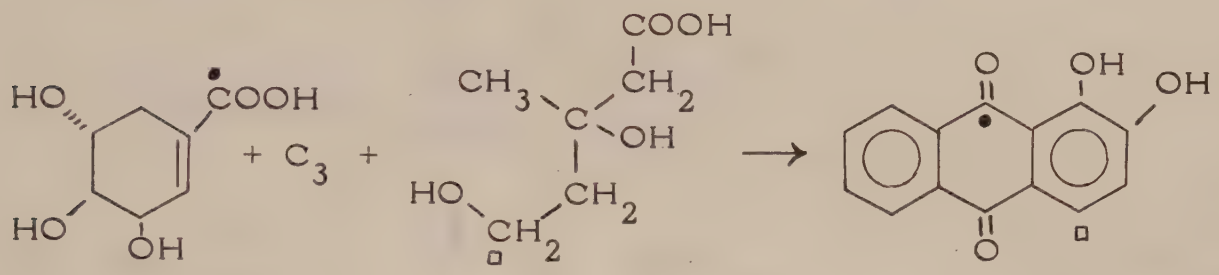
Dégradation des anthr quinones de Rubia tinctorum ayant incorporé l'OSB ^{14}COOH-2'

	Carbones conservés	Activité spécifique dpm/µmole	% rétention
Alizarine	C 9 + C 10	# 10 000	100
Diméthoxy-1,2 anthraquinone	C 9 + C 10	# 10 000 → 417	100
Acide benzoïque	C 9	412	99
Acide vératrique	C 10	1	0,2
Lucidine	C 9 + C 10	12 000	
Xanthopurpurine	C 9 + C 10	12 000 → 1 075	100
Diméthoxy-1,3 anthraquinone	C 9 + C 10	1 075	100
Acide benzoïque	C 9	1 065	99
Ac. diméthoxy-3,5 benzoïque	C 10	2,5	0,25

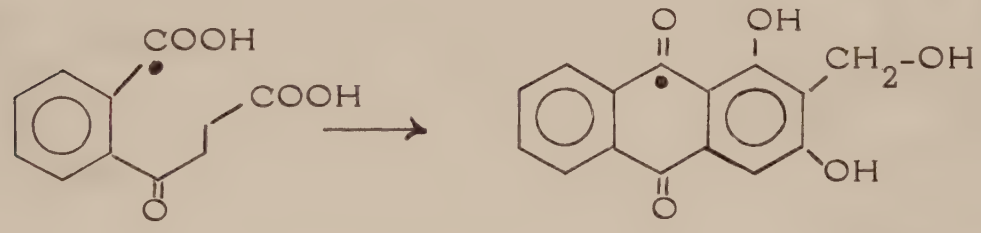
Les résultats de ce tableau montrent que, aussi bien dans l'alizarine que dans la lucidine, l'OSB est incorporé avec une orientation exclusive. Là encore, il semble exclu, en première analyse, que la naphtoquinone-1,4, molécule symétrique, puisse être un intermédiaire réel de la voie de biosynthèse de ces molécules.

.../...

Par ailleurs, on peut remarquer que nos résultats s'accordent avec ceux publiés par LEISTNER et ZENK (62,64) sur l'incorporation d'acide shikimique $^{14}COOH$ et de mévalonate ^{14}C-5 dans l'alizarine, selon le schéma ci-dessous



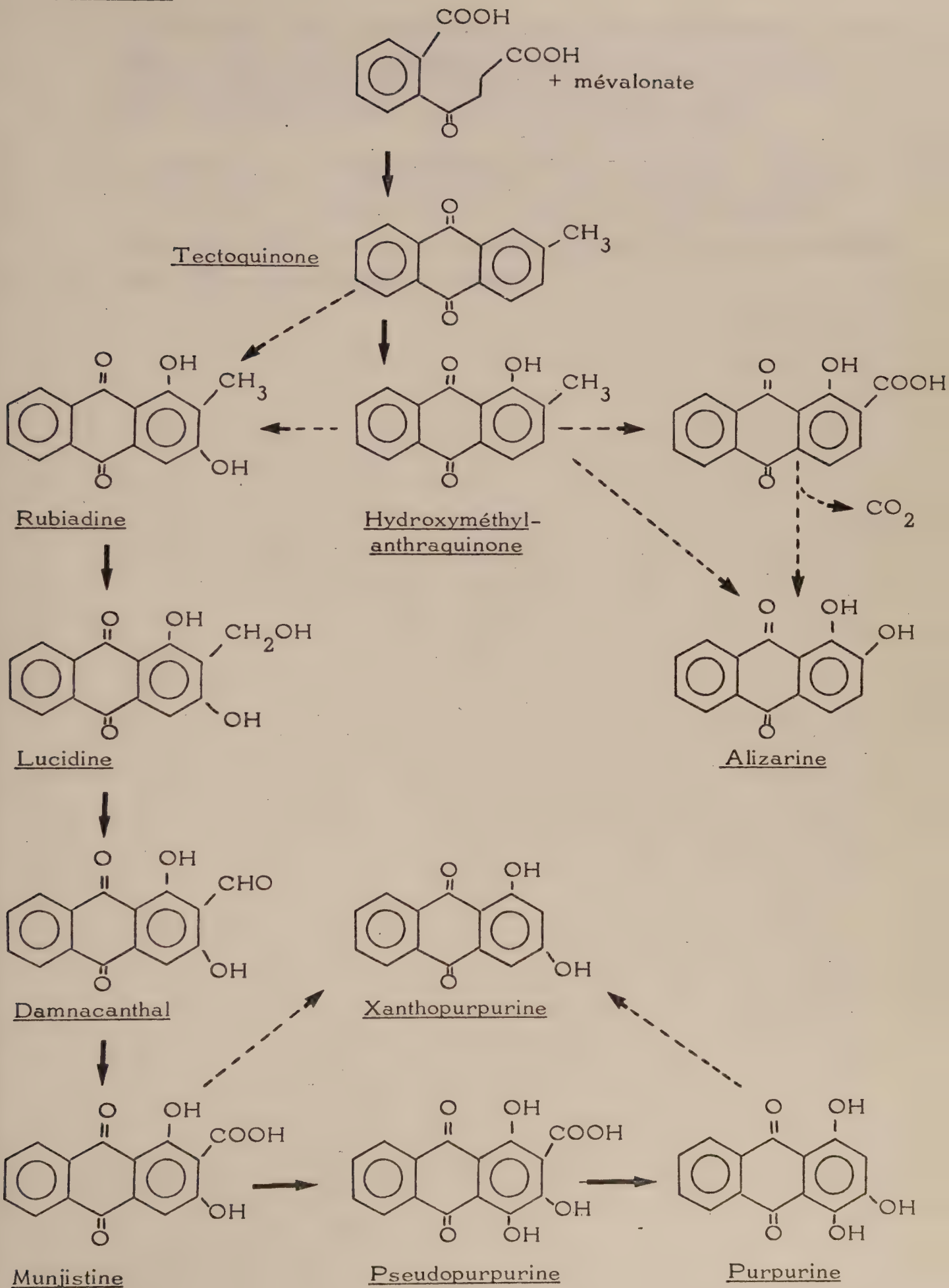
et montrant que la chaîne isoprénique s'attache sur le carbone en 3 de l'OSB intermédiaire, ce qui est évident dans notre cas pour la lucidine.



Ceci nous permet de déduire la filiation entre les différentes quinones décrites dans Rubia tinctorum (10).

.../...

Schéma 4


COOH
COOH
+ mévalonate
Tectoquinone
CH3
OH
CH3
OH
COOH
CO2
Rubiadine
Hydroxyméthyl-
anthraquinone
CH2OH
Lucidine
Alizarine
CHO
Damnacanthal
Xanthopurpurine
Munjistine
Pseudopurpurine
Purpurine

La cyclisation selon SANDERMAN (85) d'un intermédiaire naphtalénique conduit à une méthylhydroxyanthraquinone qui est oxydée en alcool, aldéhyde, acide et enfin de nouveau hydroxylée.

La formation de l'alizarine est plus difficile à expliquer, sauf si l'on suppose le passage par une forme hydroxyanthraquinone carboxylique (94), ce qui fait penser à l'acide dihydroxynaphtoïque hydroxylé et décarboxylé en lawsone.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

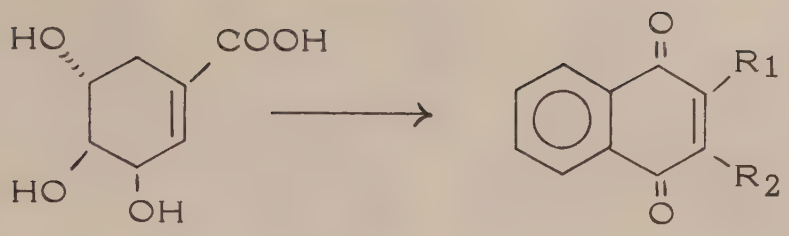
Acide shikimique.

Les premiers résultats évoqués dans ce travail montrent l'incorporation de l'acide D-shikimique dans les ménaquinones bactériennes (12,16,17,47), de même que dans deux naphtoquinones végétales, lawsone d'Impatiens balsamina et juglone de Juglans regia. Enfin, certaines anthraquinones végétales, telles celles des rubiacées (Rubia tinctorum et R. peregrina) (62,67) et scrofulariacées (Digitalis purpurea) incorporent également l'acide D-shikimique dans la partie naphtoquinonique de leur noyau (cycles A et B). Ces trois types de quinones dérivent donc toutes de la voie commune des acides aminés aromatique, via l'acide shikimique.

Des travaux plus détaillés montrent que l'acide D-shikimique s'incorpore dans tous les cas in toto, de telle sorte que son carboxyle soit conservé et devienne un des carbonyles de la quinone (12,17,65,67) Ce fait est assez rare parmi les métabolites finaux de l'acide shikimique ; ainsi dans la tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane et l'ubiquinone, le carboxyle de l'acide shikimique est éliminé à l'un des stades de la biosynthèse ; seul l'acide folique conserve ce carboxyle.

Une étude plus élaborée de l'incorporation de l'acide D-shikimique dans ces quinones permet enfin de montrer qu'elle s'effectue de telle sorte que sa double liaison 1,2 devienne celle commune aux deux cycles A et B du noyau naphtoquinonique (59,65). Ceci suppose une réactivité du carbone 2 de l'acide shikimique (ou d'un de ses dérivés) très différente de celle intervenant pour ses métabolites habituels.

.../...

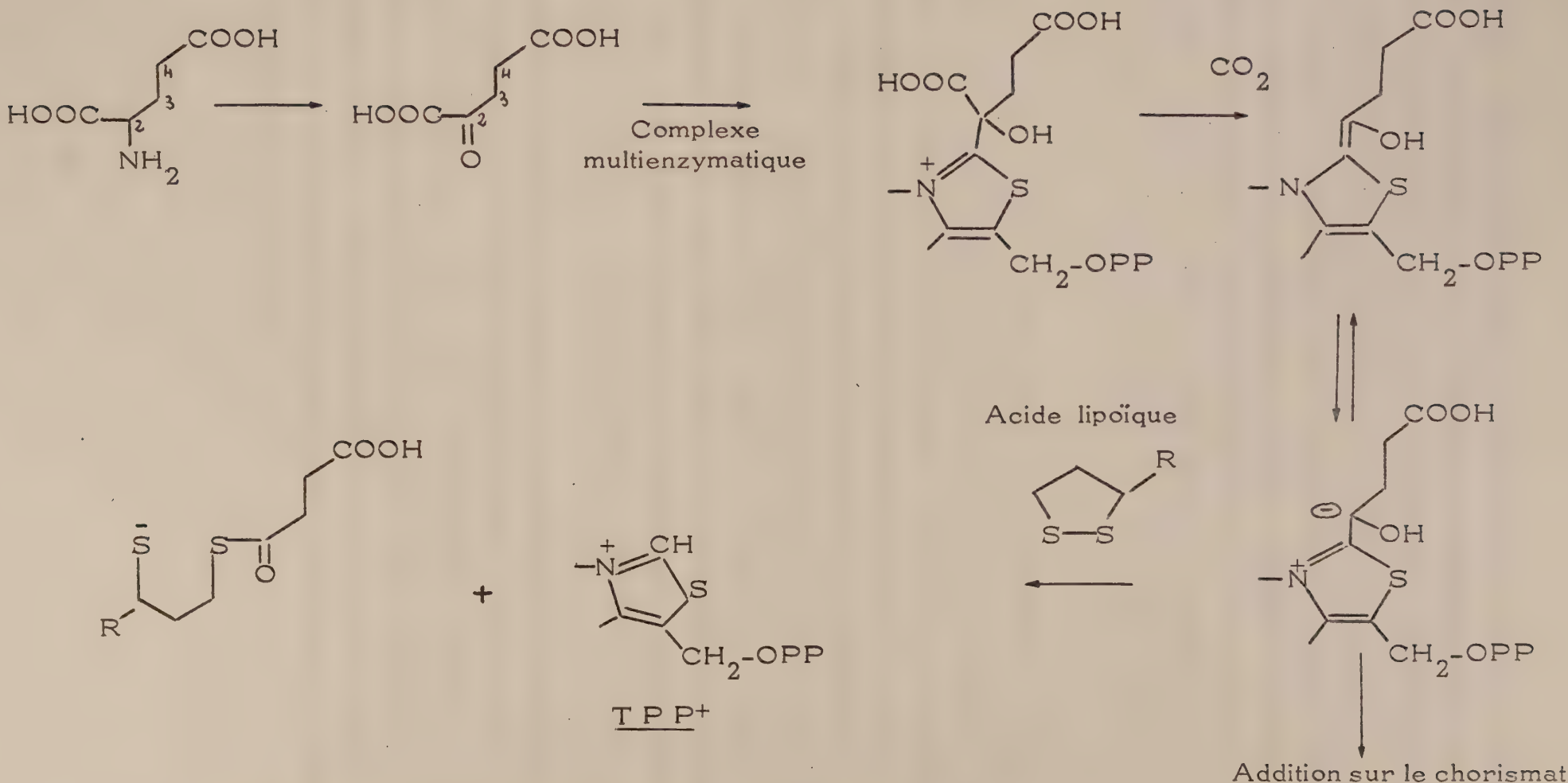


Acide glutamique.

CAMPBELL a montré que les carbones 2,3,4 de l'acide glutamique ou de l'acide α-cétoglutarique (11,13,77,78) sont incorporés dans le noyau naphtoquinonique de la lawsone et des ménaquinones. Ce même résultat est retrouvé pour la juglone et les anthraquinones (61). L'incorporation de ces trois carbones complète le cycle B du noyau naphtoquinonique, mais l'intermédiaire intervenant dans cette incorporation n'est pas connu. CAMPBELL a fait l'hypothèse que l'acide glutamique est transaminé en α-cétoglutarate, qui est lui-même oxydativement décarboxylé par le complexe multienzymatique α-cétoglutarate décarboxylase du cycle de Krebs en succinylsemialdéhydethiamine pyrophosphate, et que cet intermédiaire au lieu de réduire l'acide lipoïque pour donner le thioester de l'acide succinique, serait libéré du complexe multienzymatique pour attaquer en position 2, en tant qu'agent nucléophile puissant, la double liaison de l'acide shikimique (réaction de Michaël) pour donner un acide trihydroxycyclohexanique succinoylé, précurseur éventuel des naphtoquinones.

.../...

Schéma 4


COOH
HOOC
NH2
O
Complexe
multienzymatique
CO2
OH
N
S
CH2-OPP
Acide lipoïque
R
S—S
TPP+
Addition sur le chorismate

Aucune preuve directe n'a encore été apportée à l'appui de cette hypothèse : cette activation par le thiamine pyrophosphate paraît cependant fort judicieuse, car c'est au fond le seul intermédiaire connu capable de générer le carbanion succinoylé nécessaire à l'attaque correcte d'une double liaison cyclique. Le succinyl CoA par contre générerait un carbocation acylium (capable uniquement de la réaction de Prins) dont l'attaque se ferait sur le carbone 1 seul favorisé, et qui par ailleurs aurait dû être confirmé par une forte incorporation de l'acide succinique, ce qui n'est pas le cas (13,65).

Cependant, un point faible de l'hypothèse de CAMPBELL réside dans le fait qu'il faut supposer la libération hors du complexe multi-enzymatique d'un intermédiaire de réaction. Or ce type de système fonctionne généralement de manière totalement intégrée, et nous n'avons pu trouver dans la littérature d'exemple de libération des intermédiaires de réaction dans le milieu cellulaire, à l'exception de quelques mutants bactériens dans lesquels une partie de l'enzyme n'est plus fonctionnelle. Une étude approfondie de la biosynthèse des ménaquinones chez des mutants partiels ou complets pour ces réactions enzymatiques apporterait sans doute quelques lumières sur ce point.

Un deuxième point faible du mécanisme proposé par CAMPBELL est qu'il fait intervenir l'acide shikimique comme accepteur du carbanion semialdéhydique. En effet, LEISTNER et ZENK avaient publié que le chorismate ne s'incorpore pas dans la juglone de Juglans regia, ce qui conduisait CAMPBELL à l'écarter comme intermédiaire et à admettre le shikimate comme accepteur du carbanion succinylsemialdéhyde TPP^+.

.../...

Chorismate dans les bactéries.

Cependant, il existe chez les bactéries un certain nombre d'indications montrant que l'acide chorismique est certainement situé sur la voie biosynthétique entre l'acide shikimique et les ménaquinones. Les mutants de E. coli et A. aerogenes, bloqués avant le shikimate ne synthétisent naturellement pas de ménaquinone, de même que le mutant E. coli 159-4 bloqué après le shikimate, et le mutant A. aerogenes 170-44 bloqué dans la dernière réaction précédant le chorismate. Par contre, le mutant A. aerogenes 62-1 bloqué après le chorismate, synthétise une quantité normale de ménaquinone-8 (17).

Nos propres expériences indirectes sur l'incorporation in vivo du chorismate dans les bactéries nous ont conduit à écarter la participation directe du groupe énoylpyruvique de l'acide chorismique comme précurseur des trois C manquant pour fermer le noyau naphtoquinonique, ce qui est en accord avec les résultats de CAMPBELL critiqués ci-dessus. Mais ces expériences n'ont pu écarter la participation du noyau du chorismate à la biosynthèse des naphtoquinones.

Chorismate dans les plantes.

C'est pourquoi, il était nécessaire de reprendre l'expérience publiée par LEISTNER et ZENK sur l'incorporation de chorismate ^{14}C dans Juglans regia dans laquelle ces auteurs montraient que le chorismate marquait la phénylalanine et la tyrosine, mais pas la juglone. Bien qu'ils aient vérifié que, dans les conditions utilisées, l'acide chorismique n'était pas isomérisé spontanément en préphénate, il n'était pas impossible que cette isomérisation ait lieu à l'intérieur de la plante, au niveau d'une barrière de perméabilité

.../...

cellulaire, non perméable à l'acide chorismique, d'où l'incorporation trouvée dans la tyrosine et la phénylalanine, et la non-incorporation dans la juglone. Dans cette hypothèse, le tryptophane provenant enzymatiquement du chorismate comme la juglone ne devrait pas non plus être marqué (voir tableau XV).

Nous avons refait cette expérience, en isolant cette fois le tryptophane, et montré que ni la juglone ni le tryptophane n'étaient significativement marqués par le chorismate, confirmant ainsi l'imperméabilité cellulaire à l'acide chorismique, déjà notée par GIBSON chez les bactéries.

Par contre, chez Impatiens balsamina, cette même expérience montrait l'incorporation du chorismate dans la lawsone et le tryptophane, avec des activités spécifiques très significatives, du même ordre bien que plus faibles que celles de la tyrosine et de la phénylalanine. Ainsi, les cellules d'Impatiens balsamina sont perméables à l'acide chorismique, et celui-ci est incorporé dans la naphtoquinone de la plante.

Acide préphénique.

Deux autres intermédiaires possibles avaient été mentionnés : l'acide préphénique et l'acide isochorismique.

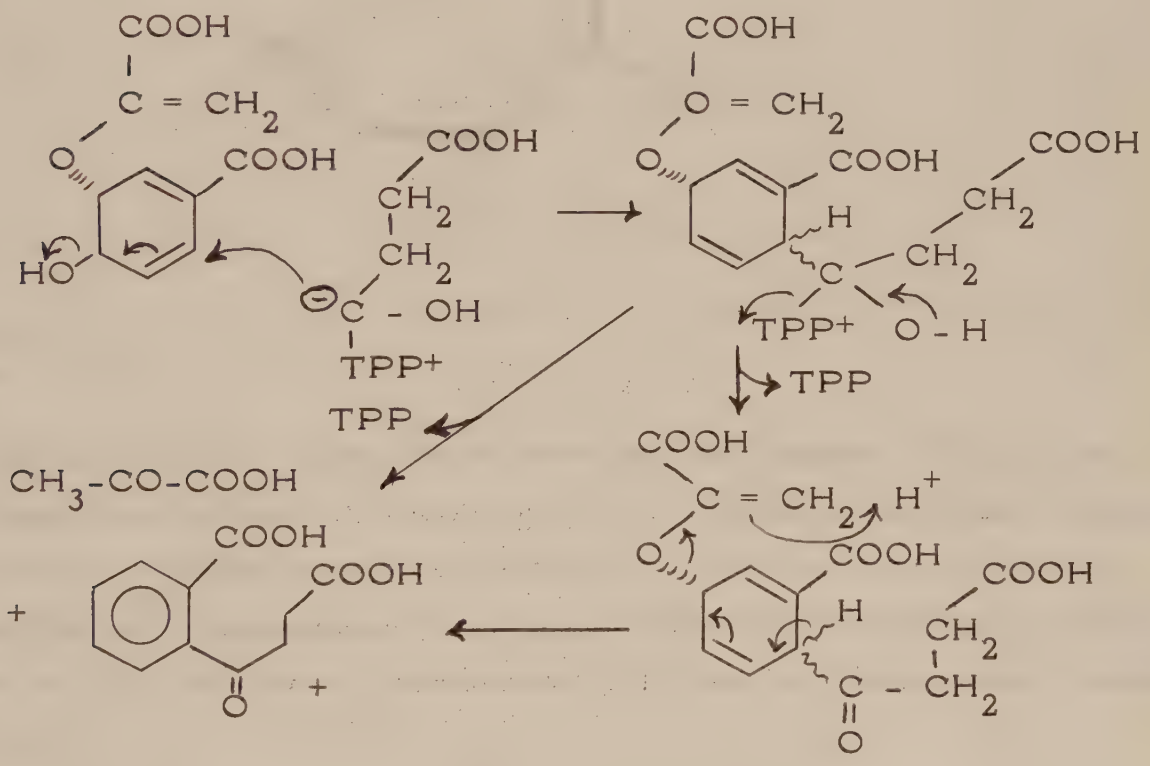
L'acide préphénique est immédiatement exclu par l'expérience sur l'incorporation du chorismate dans Juglans regia. Dans celle-ci, le marquage de la phénylalanine et de la tyrosine prouve le passage par le préphénate; si celui-ci était le précurseur de la juglone celle-ci devrait aussi être marquée, ce qui n'est pas le cas.

.../...

Acide isochorismique.

L'acide isochorismique ne peut non plus être intermédiaire car des mutants de A. aerogenes bloqués entre l'acide chorismique et l'acide isochorismique synthétisent malgré tout la ménaquinone-8 (37).

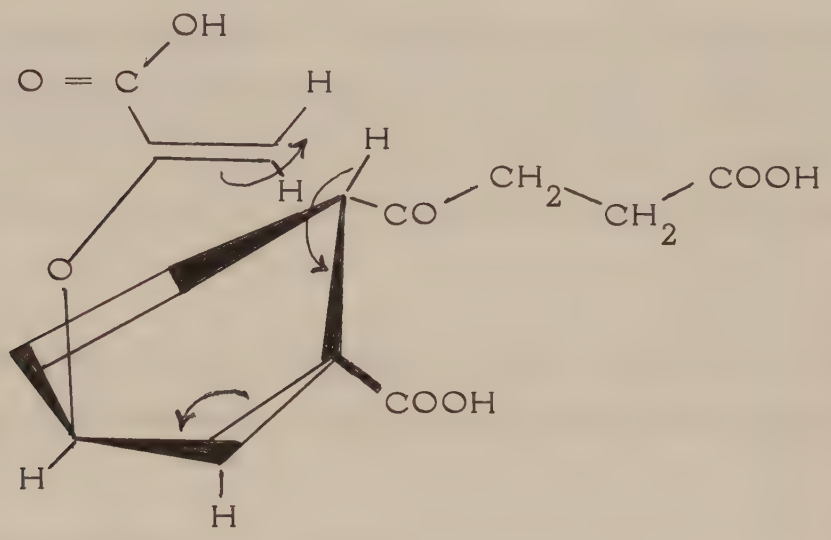
En possession de ces éléments, il devient nécessaire de modifier le schéma de CAMPBELL en remplaçant le shikimate par le chorismate. Cela aboutit, au moins sur le papier, à un schéma mécanistique très plausible, dans lequel l'attaque du carbone 6 de l'acide chorismique



par le carbanion "succinylsemialdéhyde TPP" particulièrement favorisée par la présence de la double liaison 5,6 et d'un hydroxyle allylique en 4, conduit après élimination de l'hydroxyle à un cyclohexadiène non conjugué. Cette molécule instable peut très facilement s'aromatiser par élimination 1-4 du groupe énoylpyruvique en 3 et du proton en 6. Cette aromatisation du cycle aboutit à la formation de l'OSB (acide o-succinoylbenzoïque).

.../...

Sur un modèle moléculaire, on peut remarquer que, si l'introduction du groupe succinyl se fait en position trans du groupe énoylpyruvique, (côté stériquement favorisé) l'élimination du proton en 6 et du groupe énoylpyruvique conduisant à l'aromatisation peut se faire de manière concertée, l'hydrogène en C-6 étant incorporé dans le pyruvate (*).



O S B.

Afin de vérifier ce nouveau schéma de biosynthèse, l'OSB a été synthétisé non marqué et marqué au ^{14}C. Comme expliqué dans le chapître III, l'OSB permet de restaurer la synthèse d'une quantité normale de ménaquinone chez des mutants bactériens bloqués dans la voie du chorismate, normalement déficients en ménaquinone (tableau VI).

.../...

(*) Cette hypothèse tient compte de la stéréochimie de l'isochorismate ; il est formé à partir du chorismate par introduction d'un OH en 2 et élimination de l'OH en 4, cis par rapport à l'OH [illegible] et trans par rapport au groupe énoylpyruvique (97). Elle pourrait être testée à l'aide du chorismate ^{3}H-6 ou du shikimate ^{3}H-2 dans un extrait enzymatique effectuant cette réaction. On isolerait le pyruvate et mesurerait sa radioactivité tritiée.

La concentration en OSB qui permet une synthèse maximale de ménaquinone chez E. coli et A. aerogenes est de 10^{-4} M, soit environ 5 à 10 fois plus forte que la quantité de shikimate nécessaire à cette même synthèse, ce qu'on peut expliquer à nouveau par une différence de perméabilité de la membrane cellulaire à différents précurseurs.

D'autre part, l'OSB marqué au ^{14}C sur tous ses carbones sauf le carboxyle-1 (13) est incorporé massivement sans randomisation dans les ménaquinones (chapître III), les naphtoquinones végétales (chapître IV) et les noyaux A et B de certaines anthraquinones (chapître V).

Ainsi, l'OSB satisfait à deux des critères définis par B.D. DAVIS (26) pour qu'un composé soit un intermédiaire dans une voie de biosynthèse :

- Incorporation massive
- Rôle de "vitamine" restaurant la biosynthèse chez des souches mutées en amont de l'intermédiaire (*).

Il reste cependant un dernier critère à satisfaire, l'isolement de mutants capables d'accumuler d'OSB ou l'isolement d'OSB dans un organisme synthétisant une ménaquinone ; GIBSON (37) a préparé des mutants ménaquinones de E. coli qui semblent bloqués soit avant, soit après l'OSB. Il est probable que parmi ceux-ci, certains doivent accumuler de l'OSB dans le milieu de culture, mais à notre connaissance ce travail n'est pas encore réalisé.

.../...

(*) Ce critère établi par DAVIS à propos de la biosynthèse des acides aminés indispensable à la croissance bactérienne propose que la croissance bactérienne est proportionnelle à la quantité d'intermédiaire administrée. Ici, la ménaquinone n'est pas indispensable à la croissance, mais le critère peut être remplacé par la proportionnalité de la quantité de ménaquinone formée à celle d'OSB administré (figure 1 page 47).

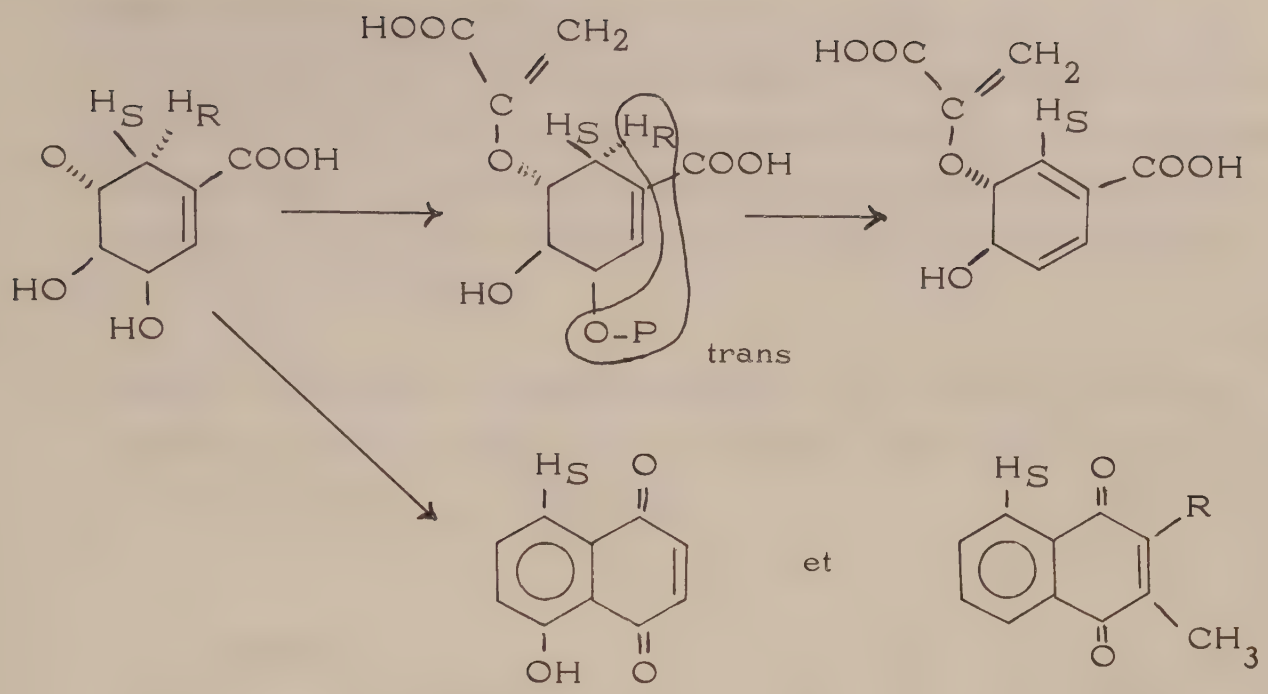
A défaut de ce troisième critère, nous avons pu montrer cependant que l'OSB est capable de diminuer efficacement l'incorporation, dans les ménaquinones bactériennes, de deux précurseurs en amont dans la voie de biosynthèse, le shikimate et le glutamate. Dans les plantes, les résultats sont moins nets, mais s'expliquent très bien par l'existence de barrières de perméabilité déjà signalées précédemment.

L'ensemble de ces arguments nous permet de conclure que l'OSB est bien un intermédiaire réel dans la voie de biosynthèse des quinones étudiées.

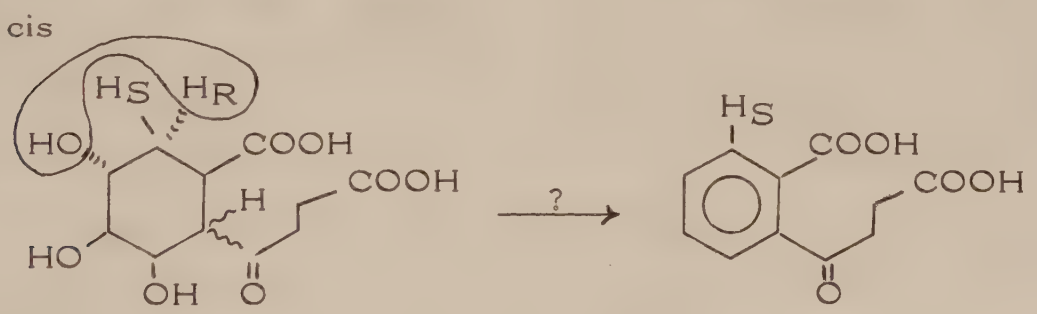
Nous avons pensé utiliser l'OSB, à cause de sa facilité d'incorporation et de sa non-randomisation, comme test de la voie shikimique dans la biosynthèse des anthraquinones. Ainsi l'OSB n'est pas incorporé dans le chrysophanol de Rheum palmatum, ce qui est un argument en faveur de la formation par voie polyacétique de cette quinone. Au contraire, la phomarine de Digitalis purpurea incorpore l'OSB 22 fois plus que l'acétate et est certainement formée par la voie du shikimate.

Il est ici nécessaire de reprendre l'hypothèse de CAMPBELL et de souligner qu'il n'est pas exclu que son intermédiaire hypothétique trihydroxylé puisse donner l'OSB. Encore qu'il semble difficile, étant donné la position adjacente des trois hydroxyles, d'aromatiser facilement cette molécule, sans envisager au moins une étape d'oxydoréduction. De plus, le rôle du chorismate semble maintenant établi, et l'attaque de l'acide chorismique pour donner l'OSB semble plus simple et plus économique du point de vue énergétique. Enfin, SCHARF, ZENK et FLOSS (86) viennent de renforcer cette manière de voir (cf chapître IV) en montrant que, lors du passage du shikimate au chorismate, ou du shikimate à la ménaquinone et à la juglone, c'est le même proton H-6 (pro R) qui est éliminé et H-6 (pro S) qui est conservé : cet hydrogène est éliminé par la chorismate-synthase avec le phosphate en 3 du phospho-3 énoyl-pyruvyl-5 shikimate, par élimination trans.

.../...



La transformation de l'intermédiaire de CAMPBELL nécessiterait une élimination cis de ce proton H-6 (pro R) avec un OH adjacent, transformation que l'on sait très exceptionnelle (2b, 87).



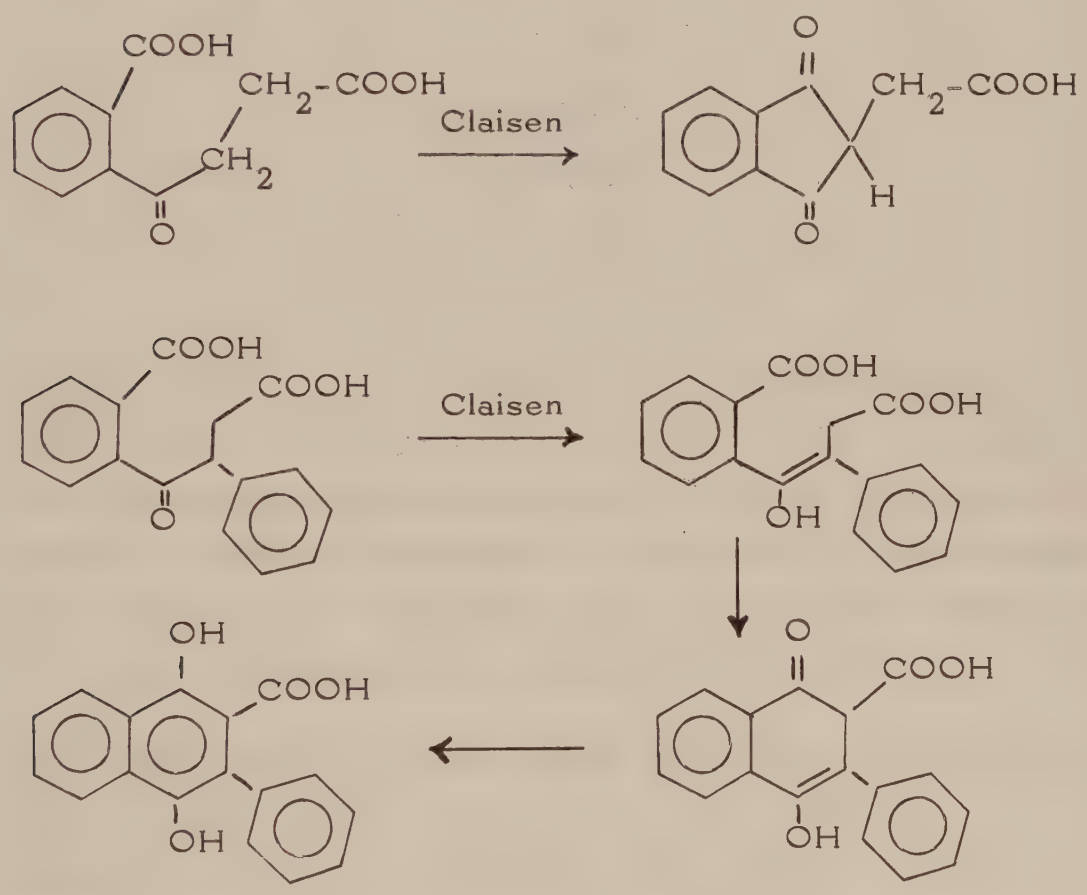
Cyclisation de l'OSB.

La cyclisation de l'OSB n'est pas encore élucidée. Il est logique de penser à une fermeture du cycle B par réaction de CLAISEN entre le carboxyle aromatique et le méthylène α. Une telle réaction n'a pu être mise en évidence chimiquement sur l'OSB lui-même qui, dans les conditions de CLAISEN, se cyclise en dérivé indanedione (cf chapître I). On a pu par contre l'obtenir facilement avec un

.../...

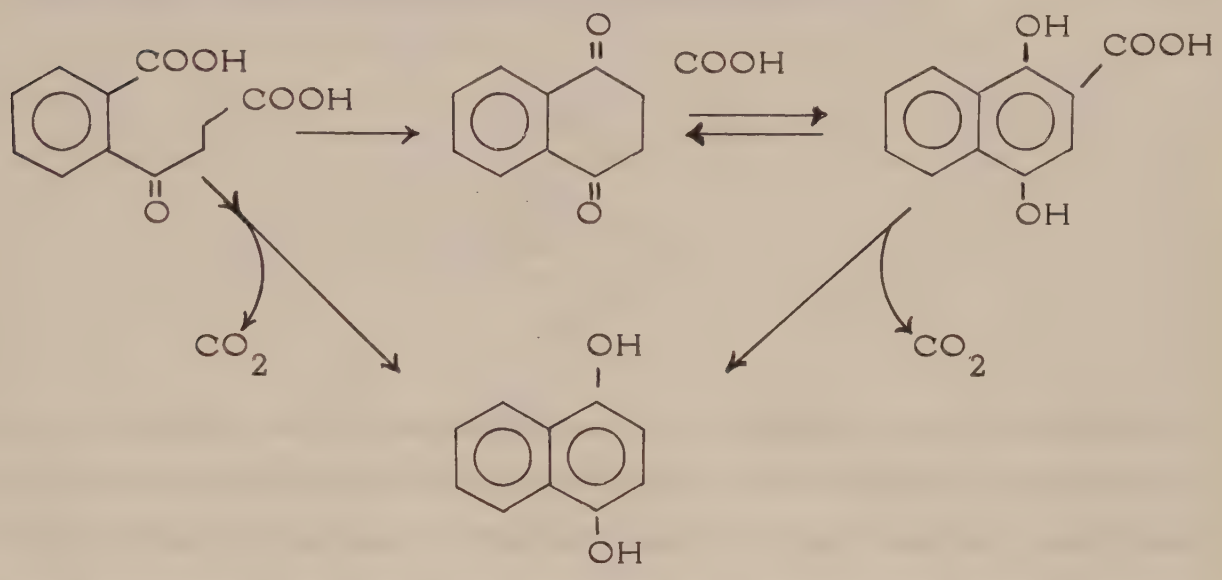
dérivé de l'OSB substitué en 3 par un groupement phényle : on peut attribuer cette réactivité particulière à la stabilisation de l'énol en 3,4 par conjugaison, ce qui augmente l'acidité en 2. Cette activation peut servir de modèle à la réaction enzymatique : l'enzyme stabiliserait une forme énolisée en 4 de l'OSB dont le méthylène en 2 serait ainsi activé.

Une autre alternative serait la formation d'un thioester activé de l'OSB (par le coenzyme A par exemple), mais un tel dérivé n'a pu encore être mis en évidence.



.../...

Dans tous les cas, le produit de la cyclisation serait l'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque, sauf dans l'hypothèse où la réaction de CLAISEN serait accompagnée de décarboxylation, ce qui conduirait à la naphtohydroquinone.

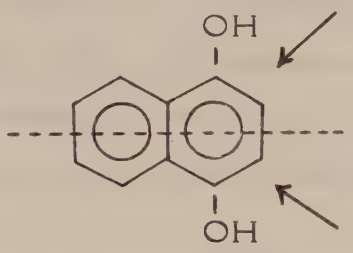


L'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque ne dilue pas de façon très significative l'incorporation de l'OSB dans la lawsone, mais ces expériences ne sont pas très concluantes en raison de la difficulté d'avoir des lots de plantes homogènes ; c'est pourquoi il est probable que des expériences de restauration de la synthèse des ménaquinones chez des mutants déficients seraient plus probantes.

La naphtoquinone-1,4 a par contre été incorporée (63,65) dans les quinones des plantes, mais avec une faible efficacité (1 à 4 %), inférieure à celle de l'OSB, ainsi que dans les ménaquinones de deux bactéries : B. melaninogenicus (70) et A. aerogenes 170-44 (47).

.../...

Entre ces deux précurseurs éventuels, il est difficile de savoir lequel est le bon ; cependant, si la naphtohydroquinone-1,4 est intermédiaire, il faut s'attendre à ce que tous les précurseurs en amont soient incorporés symétriquement (cf note page 11) puisque les réactions en aval de la naphtoquinone-1,4 peuvent s'effectuer de part et d'autre de l'axe de symétrie de cette molécule :



Au contraire, si l'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque est intermédiaire et n'est pas immédiatement décarboxylé, les réactions ultérieures de biosynthèse ne peuvent s'effectuer que d'un seul côté de cette molécule dissymétrique, et l'incorporation de précurseurs spécifiquement marqués, situés en amont de cet intermédiaire, a lieu de manière sélective dans les quinones.

Symétrie des intermédiaires ?

L'acide shikimique ^{14}C-U a été utilisé dans ce but (65) et a permis de montrer que la juglone de Juglans regia ayant incorporé cet acide était marquée également dans ses carbonyles. Par contre, CAMPBELL en mesurant l'incorporation d'acétate $^{14}CH_3$ et $^{14}COOH$ dans le carbone 3 de la lawsone de Impatiens a obtenu un résultat favorable à une incorporation dissymétrique (44).

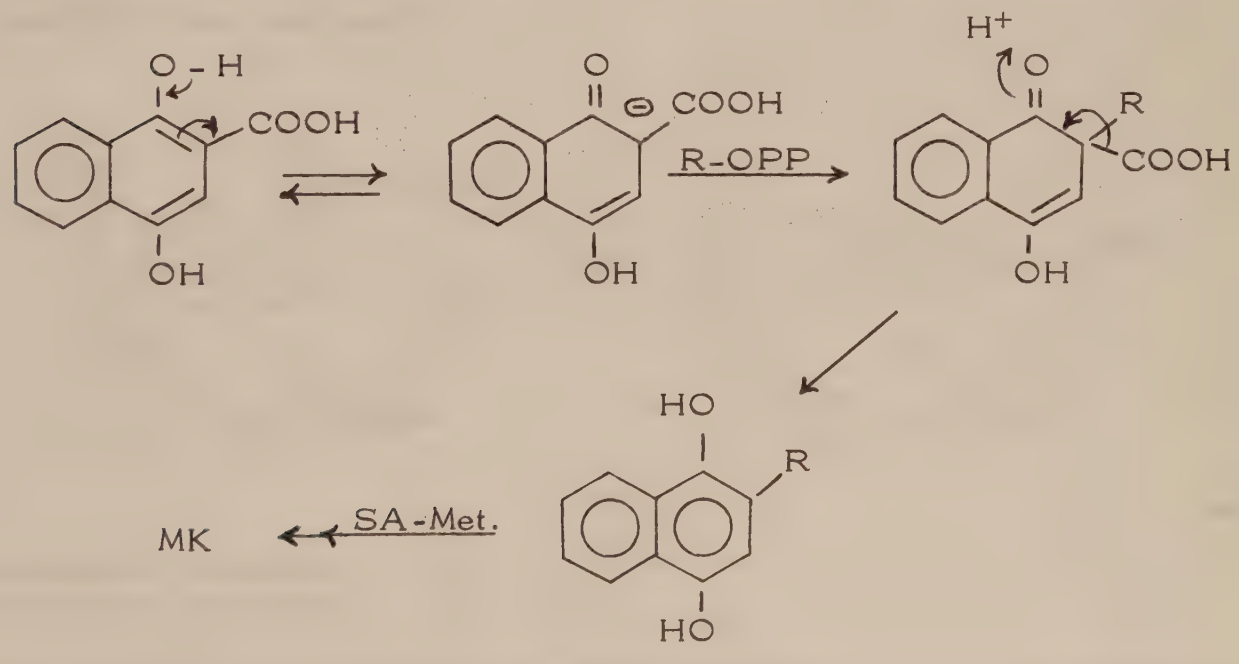
En raison de sa très forte incorporation et de sa très faible randomisation, l'OSB devait permettre, à condition de le marquer spécifiquement, de déterminer dans chaque cas l'existence ou non d'un intermédiaire symétrique.

.../...

L'OSB ^{14}COOH-2' a été incorporé dans la juglone et confirme le passage par un intermédiaire symétrique déjà constaté à l'aide d'acide shikimique.

Par contre, dans la lawsone, l'incorporation d'OSB ^{14}COOH-2' et $^{14}CH_2$-2 montre que l'intermédiaire de biosynthèse est dissymétrique, l'hydroxyle substituant le carbone 2 de l'OSB, ce qui confirme le résultat entrevu par CAMPBELL. Enfin, dans la dihydroménaquinone de M. phlei, l'incorporation des mêmes molécules montre que l'intermédiaire est aussi dissymétrique, et que la chaîne polyisoprénique substitue aussi le carbone 2 de l'OSB.

Ces deux résultats permettent d'avancer un mécanisme de réaction intéressant la forme monocétonique de l'acide dihydroxynaphtoïque peut-être stabilisée par l'enzyme. En effet, le carbone 2 est très activé pour une attaque électrophile par la présence du carboxyle, du carbonyle et de la double liaison en α (*).



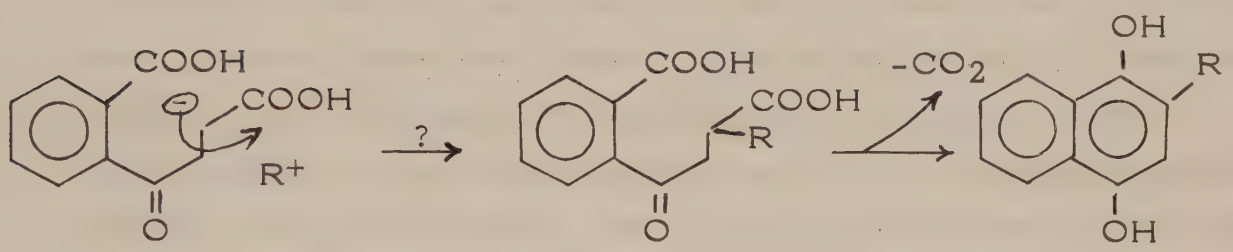
DMK réduite

.../...

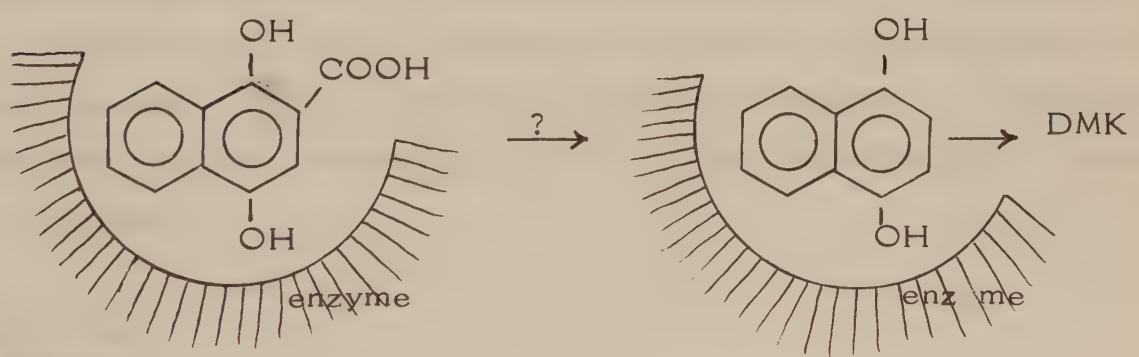
(*) Nous supposons ici la formation d'abord de desméthylménaquinone (14a) qui est ensuite méthylée par la S-adénosylméthionine. La formation de méthyl-2 naphtoquinone-1,4, intermédiaire possible chez certaines bactéries (68,70) s'explique par un mécanisme analogue où un ion méthyle + est l'agent électrophile.

Pour la lawsone, l'attaque en 2 du carbanion serait effectuée par une forme réactive de l'oxygène tel un ion hydroxonium (OH^+). La formation intermédiaire d'un époxyde n'est pas exclue.

Dans ce schéma, nous avons supposé l'attaque électrophile sur un intermédiaire cyclisé ; il est aussi possible qu'une telle attaque ait lieu directement sur l'OSB et qu'elle soit ensuite suivie de cyclisation.



Une dernière possibilité serait l'attaque après décarboxylation d'une forme naphtohydroquinonique liée à l'enzyme et qui par conséquent garderait une dissymétrie.



Naphtoquinones végétales.

Il est cependant étonnant de remarquer l'existence d'un intermédiaire symétrique pour la juglone, et d'un intermédiaire dissymétrique pour la lawsone. Ces résultats se concilient si on suppose que la lawsone serait formée par hydroxylation directe de l'acide dihydroxynaphtoïque et que la juglone dériverait d'une décarboxylation de cet acide suivie

.../...

d'hydroxylation en position 5 ou 8. Il est aussi étonnant de constater que la naphtoquinone, molécule symétrique, s'incorpore dans la lawsone (biosynthèse dissymétrique) ; ce résultat n'est explicable que si la naphtoquinone est hydroxylée par un processus de détoxication indépendant de la voie normale de biosynthèse.

Glycosides.

Il faut noter aussi que ces deux quinones n'existent pas à l'état libre dans la plante, mais sous forme réduite et glycosylée. On peut alors imaginer que l'intermédiaire dissymétrique sur lequel s'effectue l'hydroxylation en lawsone est un glycoside de la naphtohydroquinone, molécule non encore isolée. Dans le cas de la juglone, le glycoside serait formé ultérieurement après perte de la dissymétrie, juste avant hydroxylation.

Une autre hypothèse consisterait à admettre l'existence d'un complexe multienzymatique capable de reconnaître et de fixer l'OSB, molécule hydrosoluble, et de la transformer en naphtohydroquinone. Si cette molécule reste fixée sur le complexe dans la suite des réactions, la dissymétrie initiale est conservée et aboutit à la ménaquinone ou à la lawsone ; si au contraire la naphtohydroquinone est libérée du complexe, la dissymétrie est perdue et l'hydroxylation finale conduit à la juglone.

Anthraquinones.

Ce problème de l'existence d'un intermédiaire symétrique se pose de même au sujet de la biosynthèse de certaines anthraquinones dérivant de l'acide shikimique. SANDERMAN en 1957 (85) ainsi que THOMSON (94) avaient remarqué la présence simultanée dans certaines plantes (bignoniacées, verbénacées, rubiacées) de naphtols

.../...

de naphtoquinones isoprénylées et d'anthraquinones, et fait l'hypothèse que ces dernières provenaient des précédentes par cyclisation de la chaîne en C-5 sur le noyau naphtalénique. La vérification expérimentale fut apportée par LEISTNER et ZENK (64) ainsi que BURNETT et THOMSON (10), d'abord par l'incorporation de mévalonate ^{14}C dans le noyau C des anthraquinones, ensuite par l'incorporation de naphtoquinone-1,4 ^{14}C dans les noyaux A et B, enfin par celle de la diméthylallylnaphtohydroquinone ^{14}C dans l'alizarine (61).

Il est donc probable que cette biosynthèse passe par un intermédiaire naphtoquinonique substitué par un chaînon isoprénique, ce qu'on peut rapprocher de la biosynthèse des ménaquinones ; c'est pourquoi il était intéressant de comparer la position de la substitution des chaînes isopréniques sur le noyau naphtoquinonique dans ces deux types de biosynthèse.

LEISTNER (61,67) en utilisant le mévalonate ^{14}C-5 et le shikimate $^{14}COOH$ a montré une incorporation dissymétrique dans l'alizarine, l'attachement de la chaîne isoprénique se faisant sur le carbone correspondant au C-3 de l'OSB ou de l'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque. L'incorporation d'OSB $^{14}COOH$-2' dans les anthraquinones de Rubia tinctorum (alizarine et lucidine) et leur dégradation nous a permis de confirmer ce résultat, à savoir la substitution du C-3 de l'OSB par le chaînon isoprénique. Ce résultat est opposé à celui obtenu pour la ménaquinone. La signification de cette différence est encore inexpliquée.

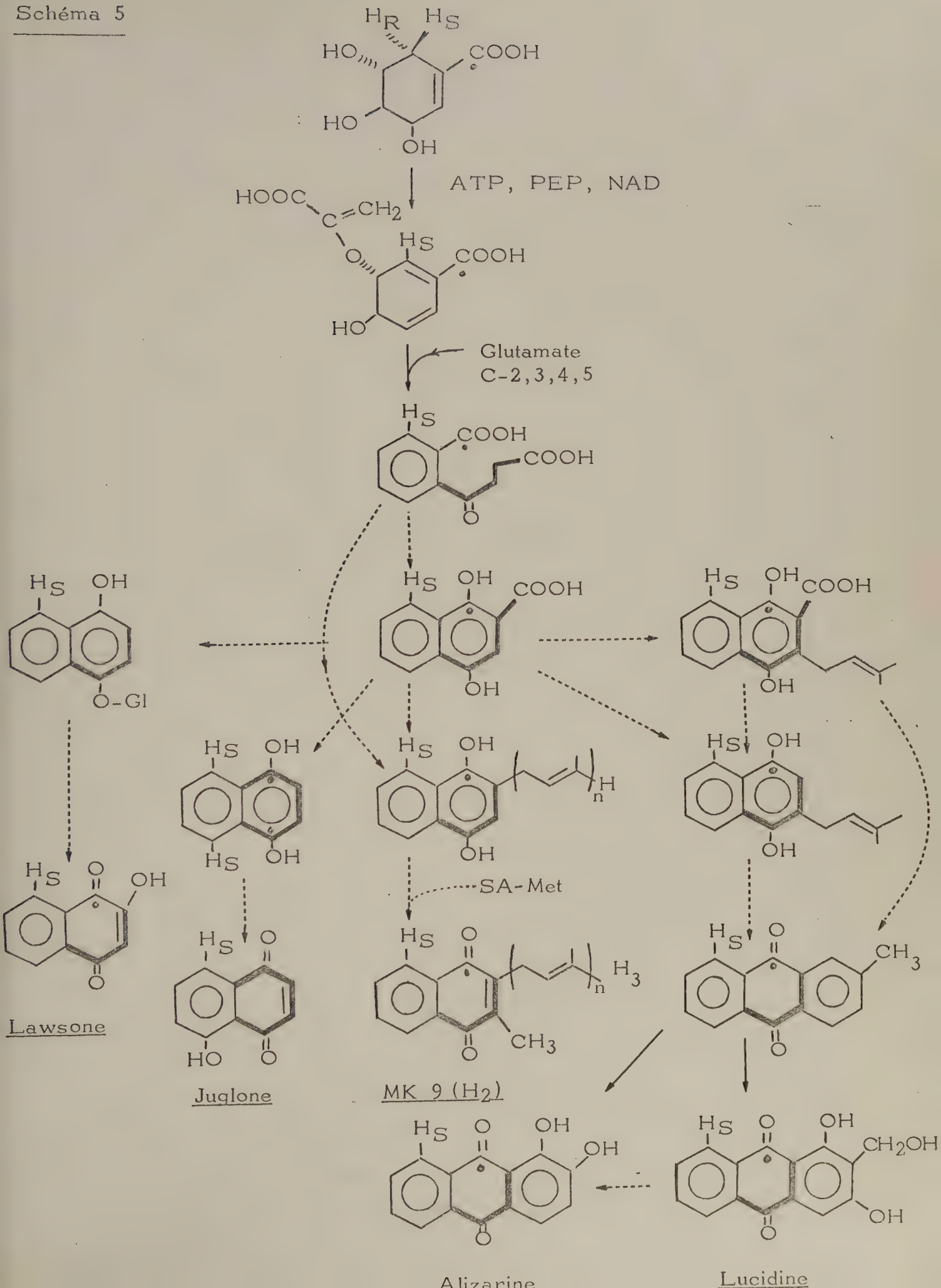
Peut-être faut-il penser que l'activation du carbone 2 de l'acide intermédiaire est nécessaire à la fermeture du cycle C de l'anthraquinone ; cependant, l'incorporation obtenue par LEISTNER de la diméthylallylnaphtohydroquinone ^{14}C dans l'alizarine (61) de Rubia tinctorum semble montrer qu'il n'en est rien.

.../...

C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier aussi le sens de l'incorporation de l'OSB dans les naphtols et naphtoquinones synthétisés par les mêmes plantes.

Les résultats présentés dans ce travail permettent à présent d'avoir une vue plus générale de la biosynthèse des quinones bactériennes et végétales dérivées de l'acide shikimique. Le schéma 5 résume l'ensemble de nos résultats et de nos hypothèses.

Schéma 5


ATP, PEP, NAD
Glutamate
C-2,3,4,5
SA-Met
Lawsone
Juglone
MK 9 (H_2)
Alizarine
Lucidine

PARTIE EXPERIMENTALE

CHROMATOGRAPHIE

Les plaques de chromatographie en couche mince utilisées sont de fabrication MERCK : 0,25 mm Silicagel G (F 254), 0,1 mm Cellulose F et 2 mm Silicagel G (F 254).

PREPARATION D'ALDEHYDES ET D'ACIDES AROMATIQUES HYDROXYLES OU AMINES

Dichlorométhylméthylsulfure (5)

Sous agitation à 0° C, on ajoute goutte à goutte 86 g (0,414 mole) de PCl_5 à 15,2 ml (12,8 g ; 0,207 mole) de diméthylsulfure ; on chauffe à reflux pendant deux heures sous agitation et distille sous pression ordinaire le PCl_3 formé, puis sous vide le dichlorométhylméthylsulfure (E_{95mm} = 70° C - E_{50mm} = 62° C). La fraction de tête est conservée à -20° C en tubes scellés. Rdt = 22 g (72 %).

p-hydroxybenzaldéhyde ^{14}C-1,2,3,4,5,6 (20,43,48)

10 mg de phénol ^{14}C-U (0,92 mCi/mmole, Radiochem. Center Amersham) sont dissous dans 2 ml de CH_2Cl_2. On ajoute à 0° C sous agitation, 20 µl de dichlorométhylméthylsulfure, puis en 30 secondes 25 µl de $SnCl_4$ anhydre. On laisse agiter 6 mn et on hydrolyse

.../...

par 1,5 ml d'HCl 10 % pendant 5 mn. On extrait trois fois par 4 ml de CH_2Cl_2, qu'on réextrait quatre fois par 3 ml d'une solution de $NaHCO_3$ à 5 %. La phase aqueuse acidifiée est saturée de NaCl puis extraite à l'éther. L'extrait séché sur sulfate de sodium est évaporé à sec, et le résidu est sublimé (100° C, 0,5-1 mm) dans un appareil à doigt de gant refroidi par le mélange acétone - carboglace. F = 114° C ; Rdt = 58 % ; activité spécifique : 0,9 mCi/mmole.

La radiochromatographie sur Silicagel G MERCK (AcOEt, $CHCl_3$, AcOH, 49 : 49 : 2, Rf = 0,41 ; Benzène-MeOH 9 : 1, Rf = 0,35) ou sur papier Whatman n° 1 (nBuOH-saturé de NH_4OH 5N, Rf = 0,53) indique une pureté supérieure à 98 %, la seule impureté étant une trace d'acide.

Après extraction par le bicarbonate, le CH_2Cl_2 contient de l'aldéhyde salicylique. Lorsque la réaction est conduite en absence de solvant, on obtient 40 % d'aldéhyde salicylique.

Dihydroxy-3,4 benzaldéhyde ^{3}H-2,5,6 (20)

A 11 mg de catéchol ^{3}H-G (12,5 mCi ; 120 mCi/mmole ; Radiochem. Center Amersham) dans 5 ml CH_2Cl_2 à 0° C, on ajoute 20 µl de dichlorométhylméthylsulfure, puis en 30 secondes 25 µl de $SnCl_4$ et on laisse agir 4 mn. On hydrolyse par 1,5 ml HCl 10 % pendant 7 mn puis on sature de NaCl et extrait au CH_2Cl_2. La phase organique est chromatographiée sur couche mince de Silicagel G par double migration (Benzène - MeOH - HCOOH 88 - 12 - 2 Rf # 0,5). L'élution à l'éther fournit l'aldéhyde (Rdt = 17-23 % ; activité spécifique : 50 mCi/mmole). On récupère aussi sur la plaque 25-30 % du catéchol de départ. (La même réaction réalisée à plusieurs reprises avec du catéchol froid a conduit à un rendement de 32-36 % ; l'activité spécifique attendue est de 90 mCi/mmole si seuls les protons aromatiques du catéchol sont tritiés également ;

.../...

l'activité trouvée de 50 mCi/mmole montre que le tritium n'est pas uniformément réparti dans les protons du catéchol).

La pureté par radiochromatographie sur Silicagel G (Benzène - EtMeCO, 7 : 3, Rf = 0,63) ou sur papier Whatman n° 1 (BuOH - AcOH - H_2O, 4 : 1 : 5, Rf = 0,77) est supérieure à 95 %, le reste de la radioactivité correspond à l'acide dihydroxy-3,4 benzoïque (Rf papier = 0,47).

Acides anthranilique et p-aminobenzoique ^{14}C-2,3,4,5,6

a) o et p-nitrotoluènes (56)

A 32,8 mg de toluène ^{14}C-2,3,4,5 (1 mCi, activité spécifique : 2,9 mCi/mmole) refroidis à 0° C, on ajoute sous agitation magnétique 75 mg (50 µl) HNO_3 concentré (d = 1,49) ; on agite pendant 4 heures à 0° C puis 15 heures à 20° C. On extrait à l'éther et obtient 43 mg du mélange d'o et p-nitrotoluène. La chromatographie en phase gazeuse (SE-30 10 % sur celite, 160°C) indique la distribution suivante des isomères formés : 55 à 65 % de para, 45 à 35 % d'ortho, traces de méta.

b) Acides o et p-nitrobenzoïques (3)

A 43 mg du mélange de nitrotoluènes dans 10 ml NaOH 6 % à reflux, on ajoute en une heure, par petites fractions, 120 mg de $KMnO_4$. On laisse refluer 2 heures, puis après refroidissement, on acidifie et décolore par du métabisulfite de sodium. On extrait à l'éther en continu pendant 18 heures.

Les acides o-et p-nitrobenzoïques sont séparés par chromatographie (58) sur deux feuilles de papier Whatman n° 3 (solvant : n-butanol-saturé d'ammoniaque 5 N ; acide o-nitrobenzoïque Rf = 0,42 ; acide p-nitrobenzoïque Rf = 0,55). Chaque acide est élué du papier au soxhlet par l'acétate d'éthyle.

.../...

c) Acides p-aminobenzoïque et anthranilique (20)

La solution de l'acide nitrobenzoïque dans l'acétate d'éthyle, concentrée à 50 ml, est hydrogénée en présence de 10 mg de Pd 10 % sur charbon. On laisse agiter pendant 3 heures à 20° C, et renouvelle trois fois l'hydrogène jusqu'à absorption quantitative. Après filtration puis évaporation du solvant, on obtient l'acide incolore cristallisé. Le radiochromatogramme sur papier Whatman n° 1 (solvant : n-butanol saturé de NH_4OH 5 N) permet de vérifier la pureté de l'acide obtenu.

Acide anthranilique : 14mg Rdt = 28% Rf = 0,24 F = 134°C pureté 99%
Acide p-aminobenzoïque : 24mg Rdt = 49% Rf = 0,08 F = 185°C pureté 99%

Acide amino-3 phtalique (40)

420 mg d'acide nitro-3 phtalique (FLUKA) dans 10 ml de méthanol sont hydrogénés sur 20 mg de Pd 10 % sur charbon pendant 3 heures. Après filtration sur coton, on évapore à sec, reprend dans l'éther, sèche sur sulfate, concentre et cristallise dans l'éther de pétrole. $F_{déc.}$ = 192° C - Rdt = 90 %.

Acide hydroxy-3 phtalique (40)

200 mg d'acide amino-3 phtalique sont ajoutés à 1 ml d'H_2SO_4 15 N à 0° C. La dissolution dure 15 mn. On ajoute goutte à goutte en 5 mn 0,4 ml de solution de nitrite de sodium à 19 % puis laisse agir à 0° C pendant 25 mn, puis au bain-marie à 70° C pendant une heure. La solution devient orange. On ajoute 10 ml d'eau, sature de NaCl et extrait à l'acétate d'éthyle ; on sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec. Le résidu est soit cristallisé dans le mélange éther - éther de pétrole, donnant l'acide F = 150 - 153° C, soit sublimé sous vide (140° C, 0,5 mm) donnant l'anhydride F = 190° C ; Rdt = 40 %.

.../...

Le dosage de cet acide est effectué par spectrométrie U.V. : en milieu éthanol 80 % ou en milieu basique, il y a élargissement et écrasement de la bande ($\varepsilon^{EtOH\ 80\%}_{320} = 3\,000$) alors qu'en milieu méthanolique acidifié (0,1 N HCl) le spectre présente une bande étroite et symétrique $\varepsilon^{MeOH}_{306} = 3\,520$. C'est ce solvant que nous avons adopté pour le dosage.

PREPARATION DE L'ACIDE D-SHIKIMIQUE ^{3}H-3

ET DE L'ACIDE CHORISMIQUE ^{3}H-5

Déhydroshikimate de méthyle

Méthode A (51,52,59)

100 mg d'oxyde de platine selon ADAMS sont hydrogénés dans 2 ml H_2O ; après décantation, on ajoute une solution de 100 mg d'acide shikimique dans 7ml H_2O et laisse barboter bulle à bulle de l'oxygène pendant 5 heures à 22° C. On filtre le catalyseur, évapore à sec à une température inférieure à 35° C et on reprend par 3 ml de méthanol ; on traite à -40° C par une solution de diazométhane en excès. Après chassage par un courant d'azote, on évapore à sec et on chromatographie sur plaque épaisse de Silicagel G (Benzène - dioxane - AcOH 90 : 25 : 4, Rf = 0,3).

On élue par le méthanol ; Rdt = 23 mg (20 %).

On vérifie la pureté par chromatographie sur Silicagel G (Benzène - MeOH 7 : 3 ; Rf # 0,35).

Méthode B (84)

On utilise une souche mutante de Escherichia coli W, isolée par DAVIS : E. coli 83-2, qui accumule de l'acide déhydroshikimique dans le milieu de culture. Cette souche est cultivée pendant 72 heures à 32° C dans un litre de milieu VOGEL et BONNER (*) contenant 10 mg L-phénylalanine, 10 mg L-tyrosine, 5 mg L-tryptophane, acide p-aminobenzoïque 10^{-6} M et 5 g de glucose (d.o finale 520 # 2).

.../...

(*) Solution concentrée : on dissout successivement dans 670 ml d'eau 6 g $MgSO_4, 4H_2O$; 100 g d'acide citrique, $1H_2O$; 500 de K_2HPO_4 ; 175 g de $NaNH_4PO_4, 4H_2O$.
Le milieu de VOGEL et BONNER est obtenu en diluant 20 ml de cette solution à un litre.

Les bactéries sont centrifugées à 0° C ; le surnageant ajusté à pH 3,5 est filtré sur 60 g de Norit. On lave par 4 l d'HCl 0,001 N puis 200 ml d'éthanol 15 %. On élue par 3 l d'éthanol absolu, évapore à sec, lave par $CHCl_3$ et traite en solution méthanolique à -40° C par du diazométhane. Après évaporation du solvant, l'ester est cristallisé dans un mélange éthanol - éther. Rdt = 120 à 200 mg ; (*) F = 124° C. (Silicagel G, Benzène - Méthanol 7 : 3 ; Rf = 0,35).

Acide D-shikimique ^{3}H-3 (42,59)

25 mCi de borohydrure de sodium ^{3}H (2 Ci/mmole) sont séchés dans l'ampoule d'origine au dessicateur en présence d'acide sulfurique afin d'éliminer la butylamine (solvant utilisé par le C.E.A. SACLAY pour le conditionnement du borohydrure radioactif).

On ajoute alors sous agitation à 0° C une solution de 12 mg de déhydroshikimate de méthyle dans 0,3 ml de méthanol, puis rince l'ampoule cinq fois avec 0,1 ml de méthanol et laisse agiter une heure.

On évapore à sec au rotavapor, ajoute 50 µl de méthanol contenant 10 % d'HCl et reprend huit fois par 0,5 ml de méthanol en évaporant chaque fois à sec afin d'éliminer l'excès de borate et d'eau tritiée. On reprend dans 0,5 ml de méthanol et traite à -40° par du diazométhane. L'excès du diazométhane est neutralisé par quelques gouttes de méthanol contenant 5 % d'acide acétique. On évapore à sec, reprend par de l'acétone sec et on filtre sur verre fritté afin d'éliminer les sels de sodium. On évapore à sec, reprend dans l'acétone et dépose sur papier Whatman n° 3 (18 cm de large). On fait une électrophorèse en tampon borate 0,2 M (12,5 g/l d'acide borique ajustés à pH 9 avec NaOH) pendant 3 heures à 30 mA - 1 200 V, avec l'acide picrique comme témoin (figure 3).

.../...

(*) Nous remercions Alexandre YAPO pour la préparation de déhydroshikimate et de la déhydroshikimate réductase de E. coli.

La fraction de R Ac picrique =-0,05 - 0,15 est l'épishikimate de méthyle ; celle de R Ac picrique = + 0,50 + 0,60 est le shikimate de méthyle.

Après séchage du papier à l'étuve à 40 ° C, on élue la fraction + 0,5 + 0,6 par du méthanol, évapore à sec et reprend par 0,5 ml NaOH 0,6 N et 0,5 ml de méthanol pendant 24 heures à 37° C.

Après dilution par 10 ml d'eau, on traite par 0,5 g Dowex 50 (forme H^+), puis on dépose sur une colonne d'Amberlite IRA 400 (100-200 mesh, forme acétate, 1 cm x 20 cm) et lave par 100 ml d'eau, puis élue par 350 ml d'acide acétique 0,5 N (figure 4). L'acide shikimique sort entre 150 et 230 ml d'acide (# 8 volumes d'élution). On évapore à sec et on ajoute 43 mg d'acide shikimique froid (FLUKA). Rdt = 2,5 mCi (10 %) ; Act. spéc. = 10 mCi/mmole.

La pureté, vérifiée par chromatographie sur cellulose MERCK (Isopr OH-NH_4OH-H_2O 7 : 1 : 2 ; Rf = 0,28 ; BuOH - AcOH - H_2O 100 : 6 : 28 ; Rf = 0,45) est supérieure à 99 %.

Stéréospécificité du transfert d'hydrogène catalysé par la NADPH-déhydroshikimate réductase de E. coli (*)

Dans une cuve de spectrophotomètre, on introduit dans un volume final de 2,3 ml : 2,46µmoles d'acide shikimique ^3H-3 (1,94 µCi/µmole), 1,1 µmole de NADP et 120 µmoles Tris-HCl pH 8,5. On ajoute 0,1 ml de DHS réductase de E. coli. Après 40 mn à 22° C, la $d.o_{340nm}$ se stabilise à 1,41 (0,54 µmole de NADPH formée).

.../...

(*) Déhydroshikimate réductase = shikimate oxydoréductase E.C.1.1.1.25. (27b).

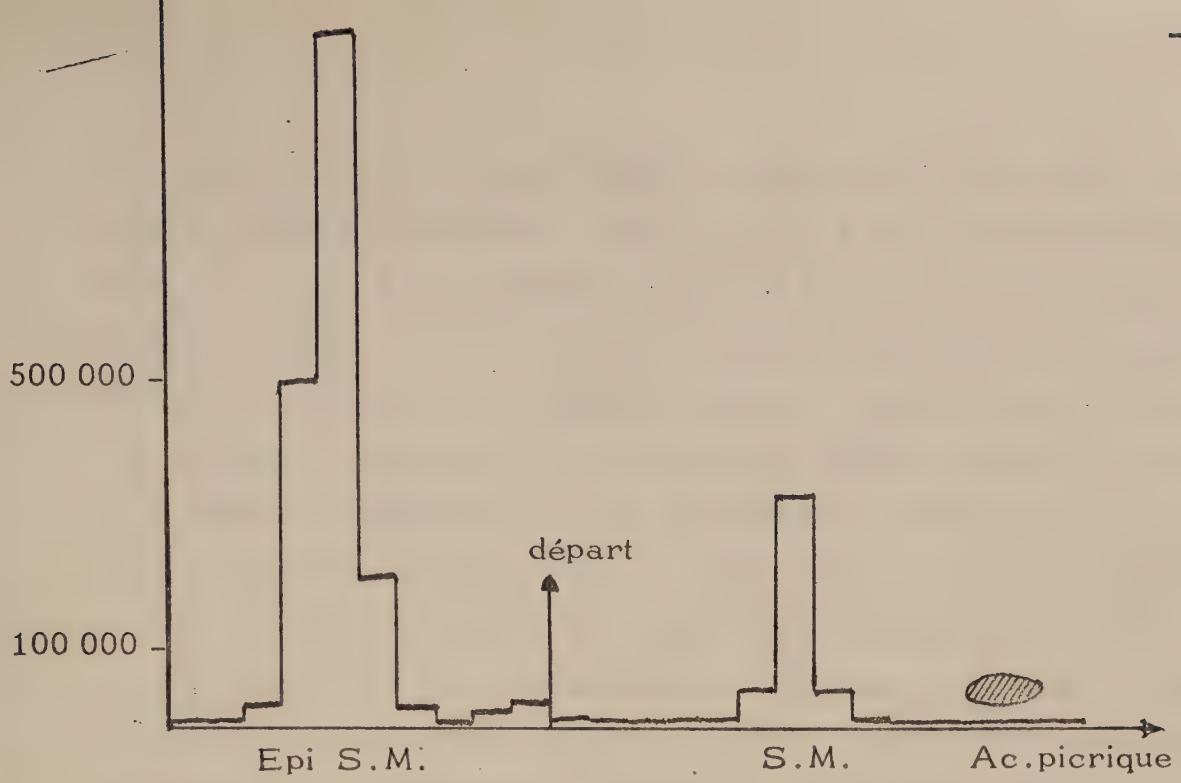


Figure 3

Electrophorèse sur papier Whatman n° 3
en tampon borate de sodium (0,2 M, pH = 9)
du mélange d'épishikimate et de shikimate de méthyle

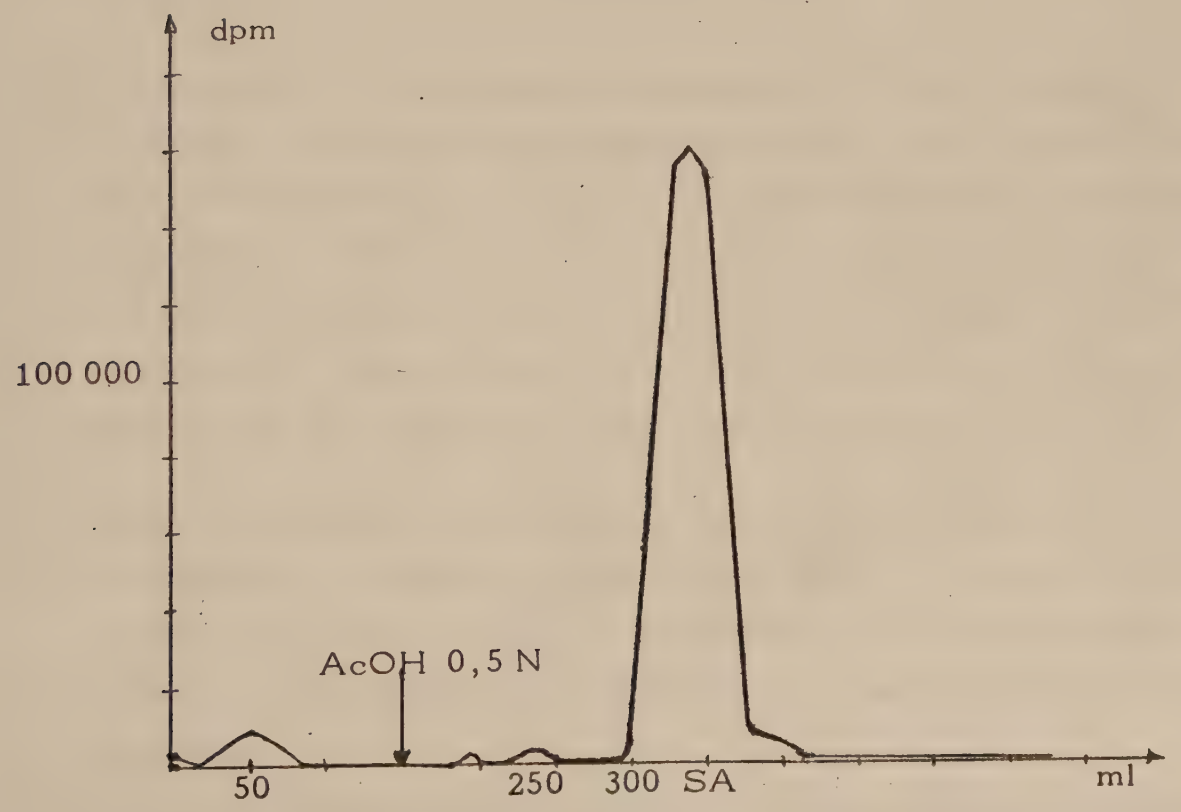


Figure 4

Chromatographie sur Amberlite IRA 400 (100-200 mesh, forme acétate)
de l'acide shikimique ^{3}H-3

On ajuste à pH 9,5 avec NaOH, fait bouillir 90 secondes, refroidit, ajuste à pH 8 avec HCl : $d.o._{340nm}$ = 1,54. On ajoute alors 5 µl NH_4Cl 1 N, 10 µl α-cétoglutarate 0,5 M , puis 2 µl de glutamate déhydrogénase de foie de porc. En une minute, la $d.o._{340}$ atteint 0,380 (0,46 µmole de NADPH oxydée). Après 5 mn, on dilue à 25 ml qu'on passe sur une colonne de DEAE cellulose (forme Cl^-, 1 x 20 cm) équilibrée avec du Tris-HCl 5 mM, pH 7,5. On élue par un gradient linéaire de 0 à 2 % de Na Cl dans du Tris-HCl 5 mM, pH 7,5 (300 ml) (figure 5). Les tubes contenant le NADP sont réunis, le pH ajusté à 7,5 et on lyophilise. On dose le NADP à 340 nm par la glucose-6-phosphate déhydrogénase et l'isocitrate déhydrogénase, et mesure sa radioactivité. Activité spécifique = 0,76 ± 0,05 µCi/µmole. Activité spécifique attendue pour le transfert stéréospécifique de l'hydrogène ^3H-3 de l'acide shikimique sur l'hydrogène H_A (pro R) du NADPH = 1,94 µCi/µmole. (*).

Préparation de l'acide chorismique ^3H-5

Des extraits d'Aerobacter aerogenes 62-1 ayant poussé sur milieu VOGEL et BONNER supplémenté en Phe, Tyr, Try 10^{-4}M, 0,5 % glucose jusqu'à une $d.o._{520}$ = 1,5 sont obtenus par sonication (20 kHerz, 100 W 3 x 1 mn) dans un tampon Tris-HCl pH 7,8 (3 ml/g bactéries humides) (39). Après centrifugation à 20 000 g, l'extrait est dialysé contre du tampon Tris-HCl pH 7,8 puis stocké à -25° C. (Il contient 25 à 30 mg protéine/ml).

Les conditions de la réaction sont celles décrites par M. et F. GIBSON : shikimate : 10 µmoles, ribose-5 phosphate : 30 µmoles, NAD : 10 µmoles ATP : 10 µmoles, $MgCl_2$: 50 µmoles dans 10 ml de Tris-HCl (pH 8,2 ; 50 mM). On ajoute alors de l'extrait dialysé (30 mg protéines).

.../...

(*) L'effet isotopique calculé selon la formule :

$$\frac{K\,^3H}{K\,^1H} = \frac{\text{Log } (1-f)}{\text{Log } (1-rf)} = \frac{\text{Log } (1 - \frac{0,54}{2,46})}{\text{Log } (1 - \frac{0,76}{1,94})} = 2,2 \pm 0,2.$$

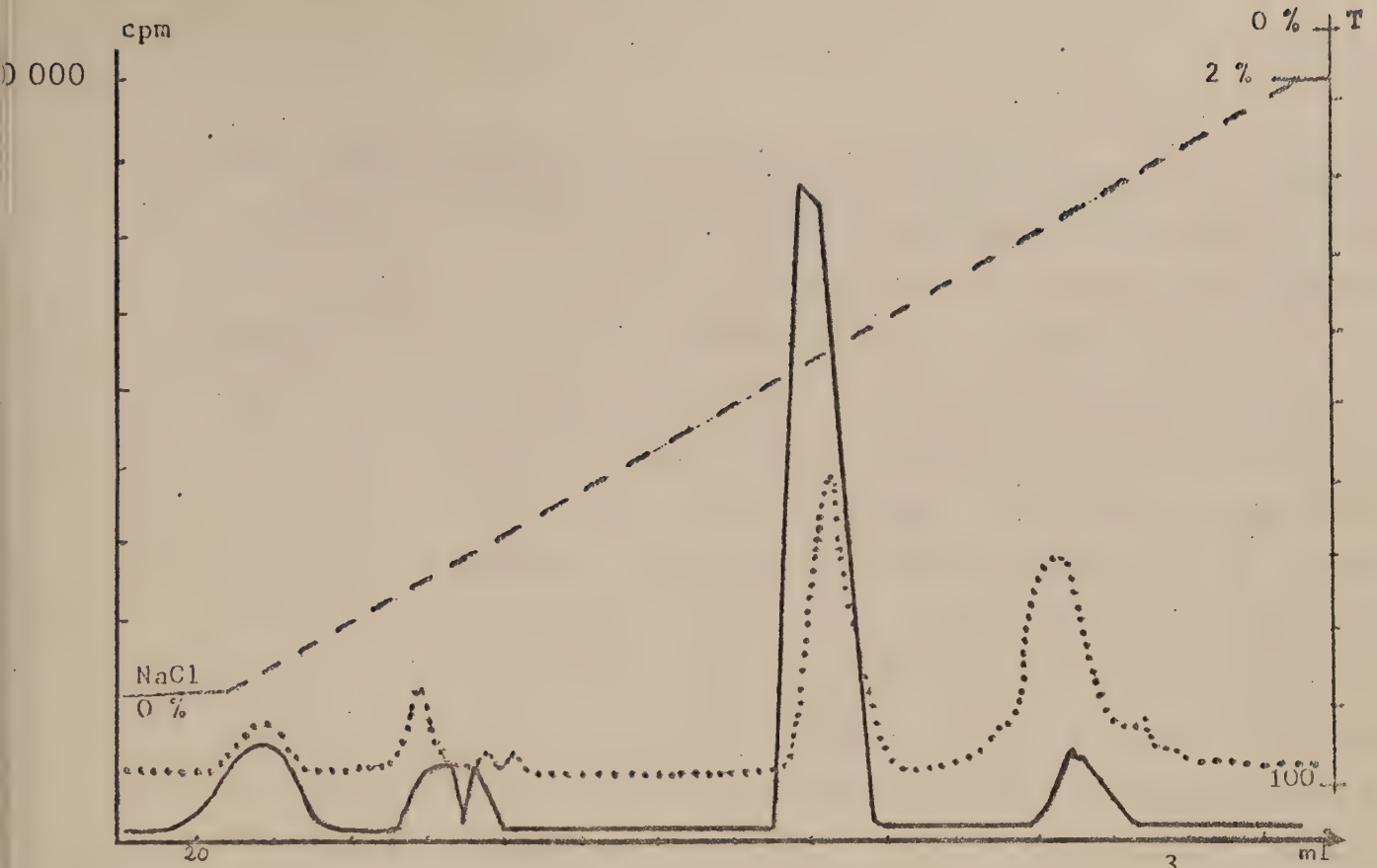


Figure 5 : Chromatographie sur DEAE Cellulose du NADP ^{3}H marqué en présence de déhydroshikimate réductase par le shikimate ^{3}H-3.

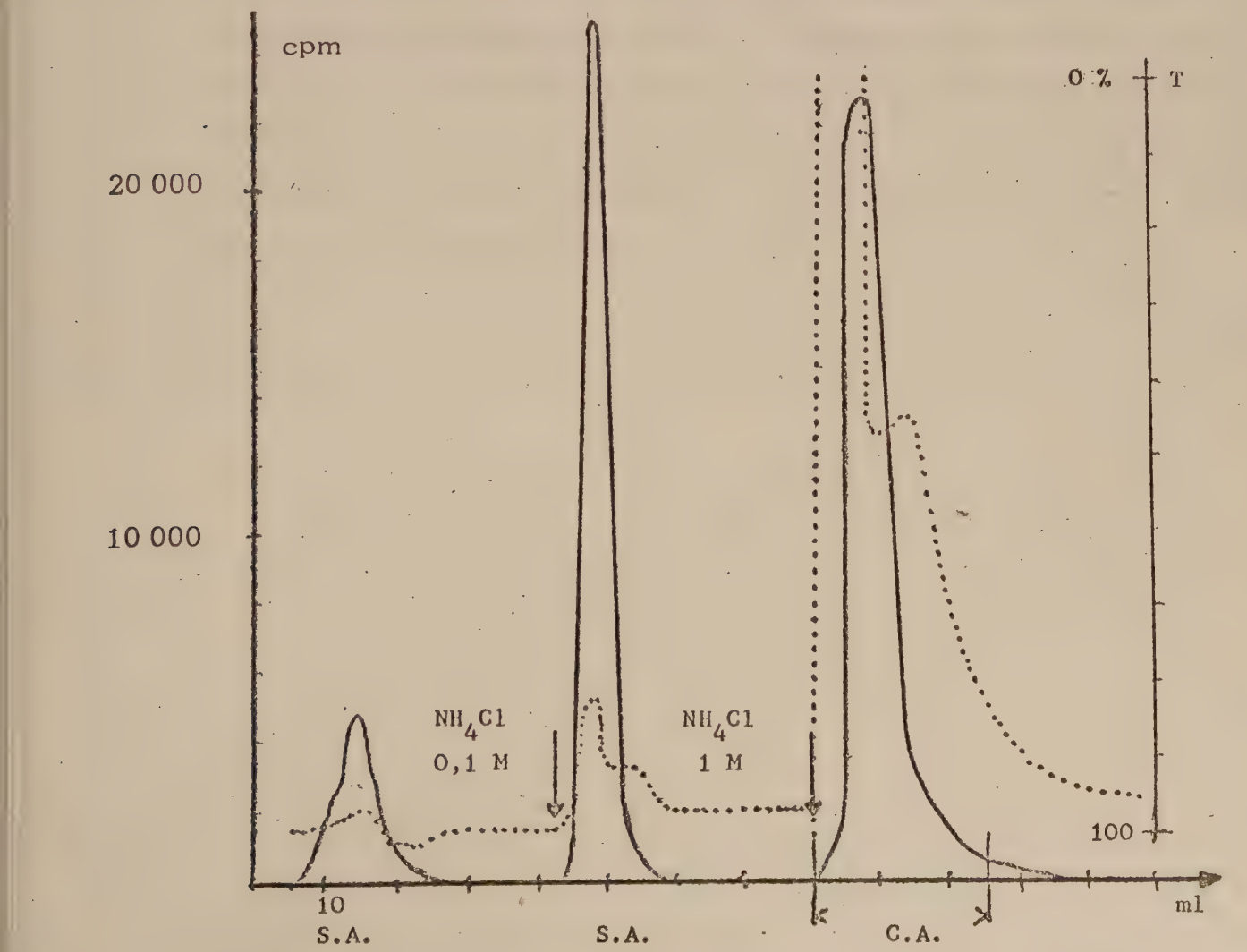


Figure 6 : Chromatographie sur Dowex 1x4 forme Cl^- de l'acide chorismique ^{3}H-5 synthétisé à partir de shikimate ^{3}H-3 par un extrait de A. aerogenes 62-1.

Une cinétique obtenue en examinant des aliquotes acidifiés et extraits à l'acétate d'éthyle à 250-290 nm montre que le maximum de synthèse de chorismate est atteint en 120-150 mn. La réaction est arrêtée au bout de 130 mn par refroidissement dans la glace. On ajuste à pH 8,5 et passe sur Dowex 1X 4 (forme Cl^-, 200-400 mesh, 4 x 1 cm). On élue le shikimate (non réagi) par 70 ml de NH_4Cl (pH 8,5 ; 0,1 M) puis le chorismate par 50 ml NH_4Cl (pH 8,5 ; 1 M). Le chorismate sort entre 4 et 24 ml (figure 6). On acidifie à pH 1,5 et extrait par l'éther (10 x 10 ml), sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec. On chromatographie analytiquement sur plaque de cellulose (Isopr OH - NH_4OH - H_2O 7 : 1 : 2, Rf = 0,35. L'impureté de Rf = 0,75 est le phénylpyruvate ou le préphénate. Il n'y a pas de shikimate Rf = 0,22).

On transforme un aliquote en acide anthranilique par un extrait d'Aerobacter aerogenes 170-44, et l'absence de shikimate est vérifiée par chromatographie sur Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH, 90 : 25 : 4, Acide anthranilique Rf = 0,4, Acide shikimique Rf = 0,05). L'acide chorismique contient uniquement comme impuretés ses produits de dégradation (# 15 %).

PREPARATION D'ACIDES BENZOIQUES ORTHO-ALCOYLES OU ORTHO-ACYLES

1°) Acide (carboxy-2' phényl)-2 acétique ^{14}C-1 (47,95) (homophtalique)

80 mg de phtalide et 16 mg KCN ^{14}C (0,5 mCi ; 2,03 mCi/mmole) sont introduits avec deux billes de verre dans une ampoule scellée. On chauffe à 180-182° C au bain d'huile pendant 3 h 30. Après refroidissement, on traite par 4 ml H_2O + 3 ml HCl concentré afin d'éliminer l'acide cyanhydrique. On neutralise par du bicarbonate saturé, et extrait le phtalide en excès par l'acétate d'éthyle.

Après acidification par HCl concentré, on extrait le nitrile par l'acétate d'éthyle. Le nitrile est hydrolysé à reflux pendant 15 h dans 6 ml d'H_2SO_4 - 50 %. On dilue et on extrait par l'acétate d'éthyle. On sèche sur sulfate de sodium et chromatographie sur plaque épaisse de Silicagel G (benzène - dioxane - acide acétique 90 : 25 : 4 ; Rf = 0,25).

On élue par l'acétate d'éthyle et obtient 6,7 mg d'acide homophtalique : Act. spéc. = 2 mCi/mmole, Rdt = 14,6 %.

La pureté, vérifiée par radiochromatographie sur plaque de cellulose (éthanol - ammoniaque - eau 80 : 16 : 4, Rf = 0,4) est meilleure que 98 %.

2°) Acide OSB et dérivés

O S B dilactone (30,80)

30 g d'anhydride phtalique et 100 g d'acide succinique sont chauffés au bain d'huile sous agitation à 217-220° C. On ajoute alors 3 g d'acétate de potassium fondu et on laisse agir 25 mn.

.../...

Il se produit un assez fort dégagement de CO_2 et le produit rougit. On coule le liquide sur un mortier et concasse après refroidissement. On reprend par 300 ml d'eau bouillante, filtre à chaud, laisse cristalliser le filtrat et filtre sur buchner. Les eaux mères servent à réextraire le résidu rouge. Après cinq réextractions, on obtient 8 g de produit crème (F = 110° C - 114° C) qu'on recristallise dans 200 ml d'eau en présence de 0,2 g de Norit. On obtient ainsi 7 g de dilactone pure. Rdt = 17 %, F = 119° C (Litt. 120°).

U.V. λ_{max}^{MeOH} = 278

I.R. $CHCl_3$: 1 800 sh ; 1 780 cm^{-1} (CO lactone)

RMN : CH_2-2 2,92 ppm J = 3 ; CH_2-3 2,83 ppm J = 3

Analyse $C_{11}H_8O_4$ - M = 204 : C = 64,7 %, H = 3,92 %, O = 31,4 %.

Acide OSB : (carboxy-2' phényl)-4 oxo-4 butyrique (80)

100 mg de dilactone sont dissous dans 1,5 ml NaOH 10 % et 4 ml d'eau. On chauffe à 100° C pendant 3 mn et, après refroidissement, on acidifie par 1 ml d'HCl 10 % et on extrait par l'acétate d'éthyle. On sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec. On dissout dans 1 ml d'éther et ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à apparition d'un trouble et laisse cristalliser à -15° C. F = 137° C (Litt. 137° C).

Chromatographie sur Silicagel G (benzène - dioxane - Ac OH 90 : 25 : 4, Rf = 0,30).

U.V. λ_{max}^{MeOH} = 278.

I.R. : CO = 1700 - 1750 OH chelation = 3000 - 3500.

RMN CH_2-2,3 : triplet à 2,83 ppm J = 8.

L'acide peut être partiellement lactonisé par chauffage à 100° C en solution acide; ou au contact du Silicagel G.

.../...

Acide (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy-4 butyrique (80)

A 100 mg d'acide OSB dans 3 ml d'éthanol 96 %, on ajoute goutte à goutte 200 mg KBH_4 dans 0,5 ml d'eau. On acidifie par HCl concentré, extrait à l'éther, sèche sur sulfate et évapore à sec. On cristallise dans un mélange éther-éther de pétrole. F_{acide} = 107° C, inchangé après recristallisation dans CCl_4 (Rdt 90 %). Le produit fondu après refroidissement donne la monolactone. F = 120°-121° C (litt. 121°). Cette monolactone s'obtient aussi par traitement d'une solution méthanolique de dilactone par du KBH_4.

L'ensemble de ces composés est facilement séparable par chromatographie sur plaque de cellulose MERCK à l'aide du solvant EtOH - NH_4OH - H_2O 80 : 16 : 4.

Acide O S B, Rf = 0,35 ; Dilactone, Rf = 0,66 ;
Acide (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy butyrique, Rf = 0,25 ;
Monolactone, Rf = 0,55.

Acide O S B ^{14}C-2',4

7 mg d'anhydride phtalique carboxyle ^{14}C (CEA Saclay, Act. spéc. = 2 µCi/µmole) et 100 mg d'acide succinique sont chauffés dans un tube. A la fusion, on ajoute 10 mg d'acétate de potassium fondu pulvérisé puis on scelle le tube qui est maintenu à 220° C pendant une heure. Après refroidissement, le tube est ouvert et son contenu est extrait par 5 x 5 ml de chloroforme. On filtre, concentre et chromatographie sur plaque épaisse de Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH, 90 : 25 : 4). Les produits de Rf 0,7 à 0,9 sont élués par l'acétate d'éthyle. On remet sur plaque Benzène - EtMeCO, 7 : 3 : Rf = 0,4. On obtient ainsi la lactone pure. Rdt = 15 µCi (17 %). Act. spéc. = 2 µCi/µmole.

.../...

L'acide est obtenu sous forme de sel de sodium par dissolution à 100° C dans 1,5 ml H_2O + 10 µl NaOH 10 % (chauffage 3 mn). La pureté testée par chromatographie sur cellulose (EtOH - NH_4OH - H_2O, 80 : 16 : 4, Rf = 0,35) ou sur papier Whatman n° 1 (Isopr OH - NH_4OH - H_2O, 8 : 1 : 1, Rf = 0,30) est supérieure à 99 %.

Acide (carboxy-2' phényl)-4 hydroxy-4 butyrique ^{14}C-2',4

0,2 ml de la solution d'acide OSB précédente sont traités à 20° C dans 0,5 ml d'éthanol par 10 mg de KBH_4. Après acidification, on extrait par l'acétate d'éthyle et chromatographie sur plaque de cellulose (EtOH - NH_4OH - H_2O, 80 : 16 : 4). Le produit de Rf = 0,25 est gratté, élué par AcOEt contenant une goutte d'HCl : Rdt = 60 %. La chromatographie analytique montre que cet acide ne contient plus d'OSB, mais un peu de sa monolactone (Rf = 0,55).

Acide O S B ^{3}H-2

A 50 mg d'acide succinique ^{3}H-2,3 (CEA Saclay, Act.spéc.= 50 mCi/mmole), on ajoute 60 mg d'anhydride phtalique. On chauffe à 185° C, ajoute 20 mg d'acétate de potassium fondu et laisse 15 mn à 190° C. Puis la température est augmentée à 230° C en 10 mn et maintenue pendant 10 mn. On refroidit et traite à l'eau bouillante pour hydrolyser l'anhydride phtalique, puis on extrait au chloroforme, sèche sur $CaCl_2$ et chromatographie sur plaque de Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH, 90 : 25 : 4). On élue la fraction Rf = 0,7 à 0,9 par l'acétate d'éthyle et rechromatographie sur Silicagel G (benzène - EtMeCO 8 : 2, Rf = 0,35). Rdt = 12 % en moles et 8 % en radioactivité. Act. spéc. = 32 µCi/µmole.

.../...

L'OSB dilactone ^{3}H ci-dessus, diluée à 5 mg par l'OSB dilactone ^{14}C ($^{3}H/^{14}C$ = 161) est mise en solution dans 1,1 ml de NaOH 0,5 N et abandonnée 18 h à température ordinaire (préparation de l'acide o-succinylbenzoïque). On acidifie par HCl, extrait l'acide à l'éther et distille la phase aqueuse. Celle-ci contient 51,5 % de la radioactivité en tritium initiale de la dilactone. L'acide isolé et purifié sur plaque a un rapport $^{3}H/^{14}C$ égal à 79, soit 49 % de l'activité spécifique en tritium de la dilactone. Au cours de l'hydrolyse, celle-ci échange donc la moitié des protons localisés en 2,3. L'acide obtenu contient 1/3 de l'activité spécifique de l'acide succinique utilisé (OSB ^{3}H-2, Act. spéc. = 16 µCi/µmole).

L'échange inverse OSB dilactone - ^{3}H-OH a été réalisé et permet d'étudier la cinétique d'incorporation : 53 mg d'OSB dilactone ^{14}C (Act. spéc. = 1900 dpm/µmole) sont dissous dans 5,5 ml de NaOH contenant 5 µl d'eau tritiée (Act. spéc. finale de H^{+} = 22 500 dpm/µproton). Des aliquotes de 0,5 ml sont acidifiés par HCl et extraits par l'acétate d'éthyle. Celui-ci est évaporé et le résidu repris plusieurs fois par l'eau et évaporé. Le rapport $^{3}H/^{14}C$ résiduel permet de calculer le nombre de protons échangés (figure 8) : $n = 2(1-e^{2,7\,(OH^{-})t})$.

.../...

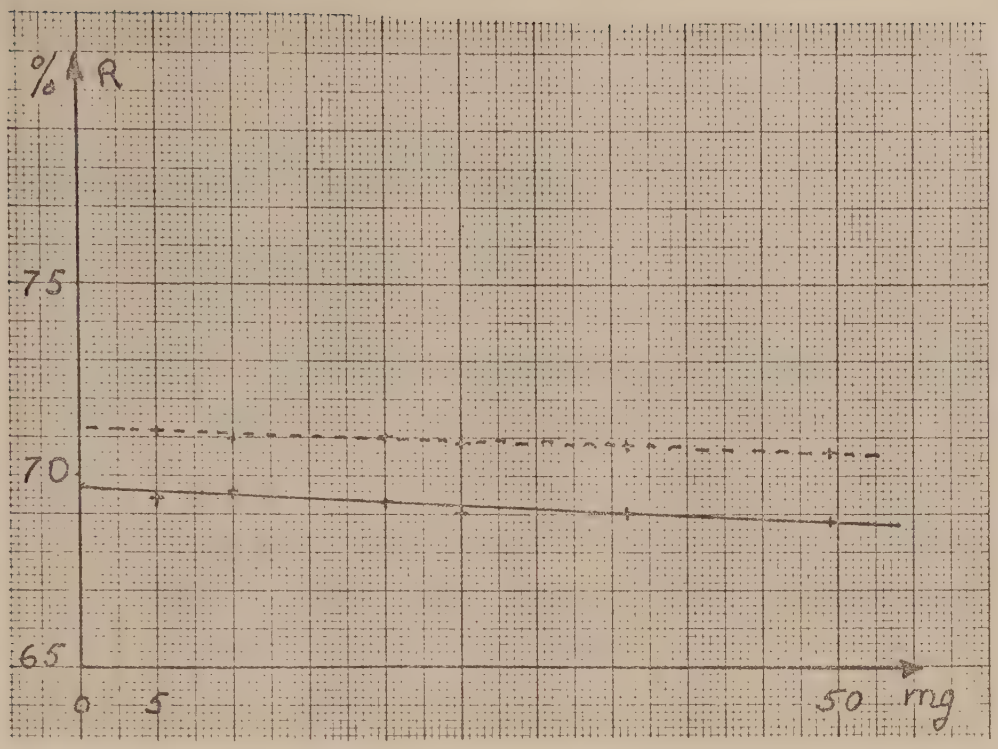


Figure 7

Standardisation du comptage du $BaCO_3$ dans 13 ml de toluène contenant 40 g Cab-O-Sil + 4 g PPO + 0,3 g diméthyl POPOP par litre.
$R = \frac{\text{dpm mesurées}}{\text{dpm réelles}}$.

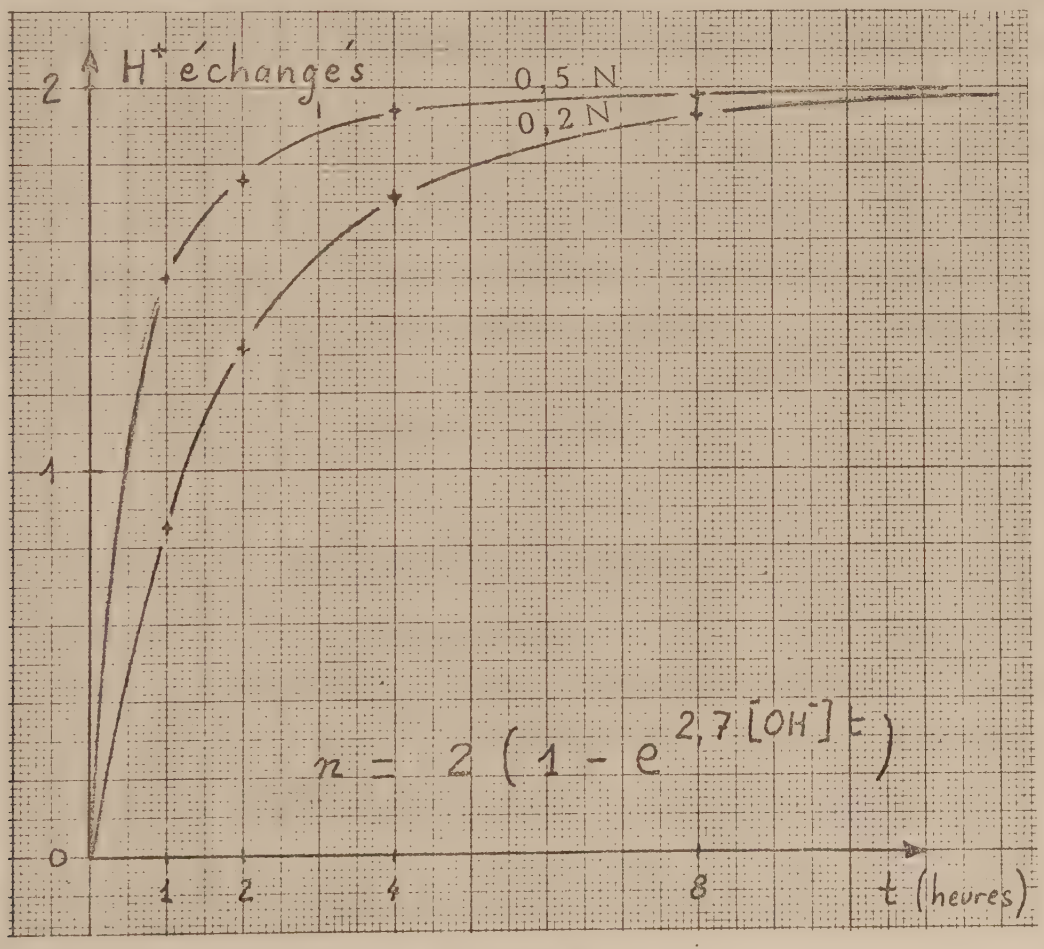


Figure 8

Echange OSB - ^3H-OH dans la soude 0,5 N et 0,2 N

Préparation de l'OSB ^{14}COOH-2'

a) Bromonitroacétophénone (9)

A 2,95 g d'o-nitroacétophénone (Koch Light) dans 20 ml de chloroforme à 50° C, on ajoute sous un éclairage de 75 W à 20 cm, goutte à goutte, 1 ml de brome. La décoloration est immédiate. On reprend deux fois dans 5 ml de benzène et évapore à sec afin d'éliminer l'eau absorbée par l'HBr formé dans la réaction. On cristallise dans 1 ml de $CHCl_3$ + 10 ml d'éther de pétrole. F = 56° C ; Rdt = 3,7 g.

b) Acide o-nitrobenzoylpropionique (89)

A 1,8 ml de malonate d'éthyle dans un ballon sec, on ajoute 4,2 ml d'éthylate de sodium 2,35 M et laisse agir 15 mn. Puis, à 5° C, on ajoute 7 ml de benzène sec et 2,24 g de bromonitroacétophénone. On laisse réagir une nuit. L'ester intermédiaire qui peut être cristallisé dans l'éther (F = 129° C) est hydrolysé par 10 ml d'acide acétique + 5 ml d'HCl concentré + 4 ml d'H_2O à 110° C pendant 15 heures. On dilue par 70 ml d'eau et extrait par l'acétate d'éthyle. On cristallise dans l'eau en présence de Norit et on obtient 700 mg d'acide nitrobenzoylpropionique. F = 112° C ; Rdt = 30 %.

c) o-aminobenzoylpropionate de méthyle (95)

200 mg d'acide nitrobenzoylpropionique sont traités dans 2 ml d'éther par du diazométhane jusqu'à dissolution du produit solide. On évapore à sec. On reprend dans 5 ml de méthanol, ajoute 10 mg de Pd sur charbon 10 % et on hydrogène. On absorbe 92 ml H_2 et obtient 190 mg d'ester huileux. Rdt = 100 %.

.../...

d) o-iodobenzoylpropionate de méthyle (95)

190 mg d'ester aminé brut sont dissous dans 0,5 ml d'HCl concentré + 1 ml d'H_2O. On ajoute à 0° C, sous agitation, 0,55 ml d'une solution de $NaNO_2$ 12,2 % et, après 5 mn, 200 mg de KI dans 0,5 ml d'eau. On laisse réagir 15 mn à 0° C puis 15 mn à 20° C et enfin une heure à 60° C. On extrait par l'éther, lave avec du bisulfite, de la soude 1 N, de l'eau et sèche sur sulfate. On évapore à sec et purifie par chromatographie sur couche mince de Silicagel G ($CHCl_3$ 0,5 % EtOH). On élue par l'acétate d'éthyle.(Rf#0,4). Rdt = 211 mg huileux.

e) Cyanure de cuivre $Cu^{14}CN$ (49,95)

Dans un tube de 150 x 13 mm à 50° C contenant 0,25 ml d'une solution de $CuSO_4$ 25 %, on ajoute 0,05 ml de solution 32 % de métabisulfite puis, après 2 mn, le $K^{14}CN$ (CEA Saclay, 1 mCi ; 48,2 mCi/mM). On rince l'ampoule deux fois avec 0,05 ml d'une solution à 16 % de KCN. On décante et on lave deux fois avec 0,2 ml d'eau, deux fois 0,2 ml d'éthanol et 0,2 ml de benzène sec. Le cyanure de cuivre est une poudre cristalline blanche. On conserve sous azote sec.

f) o-cyanobenzoylpropionate de méthyle (49)

On ajoute sur le $Cu^{14}CN$ cristallisé précédemment préparé, 74 mg d'ester iodé dans 0,6 ml de diméthylformamide purifié, congèle, laisse dégazer sous vide et scelle le tube qu'on porte à 152° C pendant 15 mn. Le contenu du tube est traité par 5 ml d'H_2O + 0,1 ml d'HCl 2 N + 0,2 ml de $FeCl_3$ 25 %. On laisse agir 30 mn à 20° C et extrait par l'éther. On lave à l'eau, sèche sur sulfate, évapore à sec et purifie par chromatographie sur plaque de Silicagel G ($CHCl_3$ - EtOH, 95 : 5, Rf = 0,5 ; puis benzène - AcOEt - AcOH, 90 : 10 : 2, Rf = 0,35 - 0,4). L'élution par l'acétate d'éthyle fournit 30 mg de produit. Rdt = 55 %.

g) Acide OSB ^{14}COOH-2'

On hydrolyse par 2 ml de NaOH 2,5 N pendant 100 heures à 37°C. On acidifie et extrait par l'acétate d'éthyle. On purifie par chromatographie sur couche mince de Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH, 90 : 25 : 4 ; Rf = 0,3) et élue par l'AcOEt. Rdt = 27 % par rapport au K^{14}CN. Le reste de la radioactivité se trouve dans une deuxième bande de Rf = 0,55.

Préparation de l'OSB $^{14}CH_2$-2

A 10 mg de pyruvate de sodium (CEA Saclay, Act. spéc. 1,1 µCi/µmole) et 15 mg de o-carboxybenzaldéhyde (Koch-Light), on ajoute 0,16 ml d'une solution aqueuse à 6,9 % de carbonate de sodium et 0,2 ml de méthanol. On met à reflux 3 h 20 (90° C) puis, après refroidissement, on ajoute 0,4 ml d'eau et 10 mg de $NaBH_4$ jusqu'à décoloration de la solution jaune (30 mn). On acidifie par 0,4 ml d'HCl 2,35 N et extrait par l'acétate d'éthyle cinq fois. On sèche sur sulfate et évapore à sec. Le résidu est repris dans 0,5 ml d'HCl 2,35 N et mis à reflux 44 h (112° C). On extrait cinq fois par AcOEt, sèche sur sulfate, purifie par chromatographie sur couche mince de Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH, 90 : 25 : 4) et élue par l'acétate d'éthyle. Rdt = 20 % par rapport au pyruvate. Il y a encore une bande radioactive juste derrière la dilactone (Rf = 0,55).

Cyclisation de l'OSB dilactone par le méthylate de sodium (30)

200 mg de lactone et 0,5 ml de méthylate de sodium 4 N sont dissous dans 10 ml de xylène et chauffés à 140° C sous azote pendant 2 heures. On obtient un précipité jaune sur les parois du ballon. Celui-ci est hydrolysé par la glace, extrait à l'éther, puis la phase aqueuse est acidifiée et extraite à l'éther. On

.../...

obtient de l'indane dione acétate de méthyle qu'on recristallise dans un mélange acide acétique - eau. F = 158-160° C (Litt. 160° C) Rdt = 50 %.

Acide dihydroxy-1,4 naphtoïque (55)

10 ml de phtalate d'éthyle et 460 mg de Na en fil sont chauffés à 100° C et on ajoute lentement 2,2 g de succinate d'éthyle sous agitation. Le mélange se colore en jaune-orange, puis après 45 mn à 110° C on obtient un solide rouge. Celui-ci est traité par 6 ml d'eau et 6 g de glace et extrait au benzène pour éliminer les produits neutres. Après acidification de la phase aqueuse, on extrait à l'éther, sèche sur sulfate et évapore à sec. L'huile rouge résiduelle est dissoute dans 2 ml d'alcool et acidifiée par une goutte d'HCl concentré. On ajoute alors quelques cristaux de glace. Des cristaux blancs crèmes de dihydroxy-1,4 naphtalate d'éthyle se séparent. F = 62° C. Rdt = 35-40 %.

500 mg de cet ester sont dissous dans 1 ml de NaOH 10 N en présence d'une trace de dithionite de sodium, et hydrolysés, à température ordinaire, pendant une nuit, en tube scellé sous vide. On casse le tube, jette sur un mélange HCl - glace et essore sur buchner. Le précipité, lavé à l'éther et séché sous vide, donne des cristaux blancs grisâtres d'acide dihydroxy-1,4 naphtoïque (F = 190° C, déc. 200° C avec dégagement de CO_2. Rdt = 60 %). Chromatographie sur plaque de cellulose ($EtOH - NH_4OH - H_2O$, 80 : 16 : 4 ; Rf = 0,25), réagit au réactif de Tollens.

.../...

ADMINISTRATION DES MOLECULES RADIOACTIVES

Bactéries :

Le produit radioactif est ajouté au milieu de culture des bactéries, et on fait pousser les bactéries normalement. On mesure, après incubation, la radioactivité restant dans le milieu de culture.

Plantes :

- Impatiens balsamina :

  Des plants de 5 à 8 semaines sont coupés en dessous du bouquet feuillu terminal. On trempe la tige de ce bouquet dans un tube contenant le produit radioactif en solution aqueuse, sous un système d'éclairage constitué par deux tubes fluorescents 60 W, lumière blanche à 60 cm. Le liquide est absorbé par la plante en 2 ou 3 heures, et remplacé par de l'eau.

  Après le temps d'incubation, on mesure la radioactivité restant dans le tube.

- Juglans regia :

  Nous avons utilisé deux types de plants :

  . des plants issus de germination depuis 2 à 3 semaines

  . des morceaux de branches de Juglans regia.

  La méthode d'incubation est la même que pour I. balsamina.

- Rubia tinctorum :

  La plante entière est utilisée. La racine est enroulée et trempe dans la solution de produit radioactif.

.../...

- Rubia peregrina :

  Seule la racine, enroulée sur elle-même, est immergée dans la solution aqueuse. L'incubation est faite à l'obscurité.

- Rheum palmatum :

  Des tranches de racine de 1 mm d'épaisseur sont immergées. L'incubation est faite à l'obscurité.

ISOLEMENT DES SUBSTANCES NATURELLES

Ménaquinones :

Les bactéries humides sont extraites environ 10 fois par 10 ml d'acétone et filtration sous vide sur papier de fibre de verre Whatman n° A. On évapore l'acétone et reprend par l'hexane tiède. Cette solution hexanique est déposée sur plaque de Silicagel G et chromatographiée dans benzène - $CHCl_3$, 1 : 1; la ménaquinone est éluée à l'éther et rechromatographiée dans hexane - EtMeCO, 9 : 1 et éventuellement en phase inversée sur papier Whatman n° 1 imbibé de vaseline, à l'aide du solvant acétone - eau, 95 : 5 saturé de vaseline. La bande jaune absorbant en U.V. est éluée par l'éther et dosée par spectrométrie U.V. : soit directement en solution cyclohexanique $\varepsilon_{248nm} = 17\,400 \quad cm^{-1}$, soit par réduction :

On fait une solution dans l'éthanol tamponné par 1 % d'acétate d'ammonium à pH 5. On répartit la solution dans la cuve de référence et dans celle de mesure. On réduit progressivement la quinone dans la cuve de mesure par une solution de borohydrure de potassium jusqu'à ce que le spectre reste inchangé. Point isobastique 284 nm. $\Delta\varepsilon_{248\ nm} = 32\,700 \quad - \quad \Delta\varepsilon_{2[illegible]} = -15\,000.$

Lawsone :

Les plants d'Impatiens balsamina sont hachés en petits morceaux de 1 à 2 mm et abandonnés dans 50 ml d'éther par gramme de plantes humides pendant 48 heures. On filtre l'éther et reprend le résidu de plantes par trois fois 5 ml de bicarbonate 5 %. On concentre l'éther à 20 ml et on l'extrait par trois fois 5 ml de bicarbonate. Les phases aqueuses réunies sont acidifiées par HCl concentré et extraites par l'acétate d'éthyle. On sèche sur sulfate, évapore à sec et dépose sur plaque préparative de Silicagel G, acidifiée par trempage 2 mn dans une solution de méthanol 5 % HCl concentré, puis séchée 10 mn à 110° C.

On chromatographie dans benzène - dioxane - AcOH, 95 : 25 : 4. La lawsone est révélée par sa coloration orange en présence de vapeur d'ammoniac (Rf # 0,7). On élue par l'acétate d'éthyle à 2 % AcOH. On rechromatographie sur plaque acidifiée (benzène - EtMeCO, 7 : 3 ; Rf # 0,5 ; benzène - AcOEt, 7 : 3 ; Rf # 0,5) ou sur cellulose (EtOH - NH_4OH - H_2O, 80 : 16 : 4 ; Rf = 0,8 ; n-BuOH - AcOH - H_2O, 8 : 1 : 1 ; Rf = 0,55).

Si l'on veut éviter l'échange des protons de la lawsone en milieu alcalin, on n'extrait pas au bicarbonate et on se contente de chromatographier dans des solvants acides ou neutres.

Triacétate de lawsone :

A une solution de lawsone (10 mg) dans 0,5 ml Ac_2O chauffée vers 100° C, on ajoute une pointe de spatule de zinc, puis après décoloration, une pointe de spatule d'acétate de sodium fondu. On chauffe 5 mn à reflux puis ajoute 2 ml d'eau et chauffe 10 mn. Après refroidissement, on extrait à l'éther, lave la phase éthérée au bicarbonate et à l'eau, sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec. Les cristaux sont recristallisés dans le méthanol. F = 137° C. Eventuellement, on purifie par chromatographie sur couche mince de Silicagel G (hexane - EtMeCO, 6 : 4 ; Rf = 0,6) et dose par spectrométrie U.V. (ε_{283}^{MeOH} = 6 450).

Juglone :

Les plants de Juglans regia hachés sont abandonnés dans l'éther (50 ml/g) pendant 48 heures. On filtre, met la solution éthérée sur plaque préparative de Silicagel G et chromatographie dans benzène - éther de pétrole, 7 : 3 ; Rf = 0,6. On élue par l'acétate d'éthyle puis le chloroforme et on rechromatographie (benzène - $CHCl_3$, 1 : 1 ; Rf = 0,5 ; hexane - EtMeCO, 8 : 2 ; Rf = 0,5). La juglone est très facilement purifiable : dès la deuxième chromatographie, l'activité spécifique est constante.

.../...

Triacétate de juglone :

A une solution de 10 mg de juglone dans 0,5 ml Ac_2O, on ajoute à 100° C une pointe de spatule de zinc, puis après décoloration, une pointe de spatule d'acétate de sodium fondu. Après 5 mn d'ébullition, on ajoute 2 ml d'eau, laisse bouillir 10 mn et, après refroidissement, extrait à l'éther. L'éther est lavé au bicarbonate et à l'eau, séché sur sulfate et évaporé à sec. Les cristaux sont recristallisés dans le méthanol. F = 129° C. On purifie par chromatographie sur couche mince de Silicagel G (hexane - EtMeCO, 6 : 4 ; Rf = 0,6).
$\varepsilon_{289}^{MeOH} = 9\,100$.

Anthraquinones de Rubia peregrina L :

13 g de racines de Rubia sont coupés en morceaux de 5 mm et séchés à l'air. On broie en poudre fine qu'on extrait par 200 ml de benzène dans un soxhlet. On chromatographie sur plaques de Silicagel G (benzène - $CHCl_3$, 1 : 1) et on obtient 4 bandes de Rf = 0,02 ; 0,6 ; 0,7 et 0,8. La bande de Rf 0,6 est éluée par l'acétate d'éthyle et donne 44 mg de cristaux oranges de rubiadine (F = 292° C MW = 254 ; U.V. λmax = 241 sh, 245, 279, 414 nm)
La bande de Rf = 0,8 donne des cristaux jaunes de rubiadine - méthyléther (MW = 268 ; λ max = 239, 243, 279, 372 nm).

Le résidu de l'extraction benzénique est à nouveau extrait par 200 ml d'acétone. Dans le ballon du soxhlet cristallise une poudre rouge (F = 216-217° C) qu'on recristallise dans 4 ml de benzène. On obtient ainsi 10,5 mg de pseudopurpurine. (F = 218-220° C ; MW = 300 ; λ_{max}^{MeOH} = 256,5 nm, 285 nm, 487 nm, 520 nm) (94).

.../...

Anthraquinones de Rubia tinctorum : (isolement des esters méthyliques)

On broie finement des rhizomes et extrait la poudre (7 g) au soxhlet, d'abord par 200 ml de benzène, ensuite par 200 ml d'acétone.

L'extrait benzénique laisse déposer des cristaux jaunes (A) (8 mg - F > 320° C). L'extrait est chromatographié sur cinq plaques de Silicagel G acidifié par 3 % d'acide oxalique, dans le mélange $CHCl_3$ - EtOH, 95 : 5. On élue une bande orange de Rf = 0,45-0,55 correspondant à l'alizarine. Cette alizarine est diluée à 100 mg et méthylée dans 40 ml d'acétone à reflux en présence de 2 g de K_2CO_3 et 1 ml de diméthylsulfate pendant 16 heures. Après filtration, on concentre à 5 ml et dilue par 20 ml d'eau : l'éther méthylique cristallise en plaques jaunes. On recristallise dans 6 ml de méthanol et obtient 30 mg de diméthoxy-1,2 anthraquinone pure (F = 215° C ; chromatographie sur Silicagel G - benzène - EtMeCO, 8 : 2 ; Rf = 0,55 λ_{max}^{MeOH} = 251, 280, 331, 435 nm ; ε_{280} = 19 700).

Les cristaux (A) sont identifiés par leur spectre U.V. à la lucidine (λ_{max}^{MeOH} = 242, 247, 280, 333 et 415 nm). Ce produit est difficile à sublimer sans décomposition, et reste au départ sur plaque de Silicagel G acidifié. C'est pourquoi ce produit a été oxydé à 75-80° C dans 2 ml de NaOH 1 N par 10 mg d'oxyde d'argent pendant une heure. Après acidification, on extrait par l'acétate d'éthyle, sèche et obtient des cristaux oranges foncés (λ_{max}^{MeOH} = 248, 263 sh, 280, 330 et 420 nm) de munjistine. Par chromatographie sur plaque de Silicagel G, on vérifie que la munjistine ne contient pas de xanthopurpurine (benzène - EtMeCO - AcOH, 80 : 20 : 1) (munjistine Rf # 0,05 xanthopurpurine Rf = 0,45). La munjistine est décarboxylée par sublimation (220° / 0,1 mm) et la xanthopurpurine obtenue est purifiée par chromatographie sur Silicagel G (benzène - EtMeCO - AcOH, 80 : 20 : 1 Rf = 0,45), éluée par le méthanol (λ_{max}^{MeOH} = 241, 246, 280, 330 et 415 nm).

.../...

On dilue par 6,4 mg de xanthopurpurine et méthyle à reflux dans l'acétone sec en présence de 0,2 g de K_2CO_3 et 0,1 ml de diméthylsulfate pendant 15 heures puis 0,1 g de K_2CO_3 et 0,05 ml de diméthylsulfate pendant 15 heures. On filtre, concentre et chromatographie la diméthoxy-1,3 anthraquinone sur Silicagel G (benzène - EtMeCO - AcOH, 80 : 20 : 1 ; Rf = 0,4 ; λ_{max}^{MeOH} = 227, 239, 247, 277, 330 et 390 nm).

Le rendement de l'isolement de la lucidine radioactive, par cette méthode, est d'environ 8 %. On dose en spectrométrie U.V. la diméthoxy-anthraquinone ε^{MeOH} = 30 900.

DEGRADATION DES QUINONES

Oxydation en acide phtalique des ménaquinones (47,59)

200 µmoles de ménaquinone sont dissoutes dans 30 ml de pyridine additionnés de 3 gouttes d'eau. On chauffe à 65-70° C et ajoute, en 6 heures, 2 g de permanganate de potassium. Le mélange est évaporé à sec, repris par 10 ml d'eau et acidifié par H_2SO_4 50 %, puis décoloré par addition de métabisulfite de sodium. On extrait en continu 20 heures par l'éther. L'acide phtalique obtenu est chromatographié sur quatre plaques de cellulose (Ethanol - ammoniaque - eau, 80 : 16 : 4, Rf = 0,2). La bande, acidifiée par pulvérisation d'HCl 10 %, est extraite au soxhlet par l'éther. On purifie l'acide phtalique obtenu jusqu'à activité spécifique constante, soit par sublimation (150° C, 0,2 mm), soit par cristallisation dans le chloroforme. Rdt = 50 à 60 %.

Oxydation en acide phtalique de la lawsone (59)

10 mg d'hydroxy-2 naphtoquinone-1,4 sont dissous dans 1 ml de soude 2 N. On ajoute sous agitation à 20° C, 1 ml d'une solution de permanganante de potassium à 100 g/l jusqu'à coloration violette persistante. Après 30 mn, on acidifie par HCl concentré et décolore par addition de métabisulfite de sodium solide. On extrait à l'acétate d'éthyle, sèche sur sulfate et évapore à sec. On lave au chloroforme, on purifie par chromatographie sur cellulose comme précédemment, puis on sublime. Rdt = 90 %.

Oxydation en acide phtalique de la pseudopurpurine :

3,5 mg de pseudopurpurine sont dissous dans 2 ml de soude 2 N chaude. Après refroidissement, on ajoute 0,5 ml d'une solution de $KMnO_4$ à 100 g/l et laisse agir une heure. On acidifie par HCl concentré et décolore par du métabisulfite. On extrait par l'acétate d'éthyle et purifie comme précédemment. Rdt = 75 %.

.../...

Oxydation de la juglone en acide hydroxy-3 phtalique (65)

18 mg de quinone dans 6,5 ml de soude 1 N sont traités à reflux pendant 30 mn par 1 ml d'H_2O_2 30 % puis encore 10 mn après addition de 0,25 ml d'H_2O_2 30 %.

Après refroidissement, on extrait au chloroforme. La phase aqueuse acidifiée par H_2SO_4 2 N est extraite par l'acétate d'éthyle qu'on sèche, évapore à sec et met sur plaque de cellulose. On chromatographie dans EtOH - NH_4OH - H_2O, 80 : 16 : 4 par deux migrations. La bande fluorescente bleu-clair de Rf 0,3 est acidifiée par pulvérisation d'HCl 10 % et éluée par l'acétone. On rechromatographie dans Isopr OH - NH_4OH - H_2O, 6 : 1 : 1 ; Rf = 0,3 ; élue par du méthanol acidifié et dose par spectrométrie U.V. à 306 nm (Cf p. 114-115).

Décarboxylation de l'acide phtalique (47,83)

30 mg d'acide phtalique et 100 mg de chromite de cuivre sont mis en suspension dans 1 ml de quinoléine (FLUKA). On porte à reflux 1 h 30 : le gaz carbonique dégagé, entraîné par un courant d'azote (une bulle/seconde) est recueilli dans 4 ml de soude 2 N décarbonatée.

Cette soude est ensuite versée sur 5 ml de $BaCl_2$ 10 % et le précipité de carbonate de baryum, centrifugé, lavé à l'eau puis à l'acétone, est séché sous vide. On compte 10 à 20 mg de la poudre cristallisée en suspension dans un gel de toluène scintillant à 4 % de Cab O Sil. Le rendement du comptage est de l'ordre de 70 % et dépend de la quantité de $BaCO_3$ en suspension (cf figure 7 p. 128).

Décarboxylation de l'acide hydroxy-3 phtalique (65)

20 mg d'acide hydroxy-3 phtalique sont dissous dans 2,5 ml d'eau. On ajoute 2,5 ml d'H_2SO_4 concentré puis porte à 130° C pendant une heure. Le gaz carbonique dégagé, entraîné par un courant

.../...

d'azote, est recueilli comme précédemment et compté de même. On obtient 20,9 mg de carbonate de baryum (Rdt = 97 %).

La phase aqueuse est extraite par l'éther. On sèche, évapore à sec et recristallise dans l'alcool. L'acide hydroxy-3 benzoïque obtenu est dosé par spectrométrie U.V. $\varepsilon^{MeOH}_{298\ nm} = 2\,570$. Rdt = 55 %.

Bromuration de la juglone :

2,5 mg de juglone sont traités à 97° C pendant 3 heures par 0,5 ml d'acide acétique contenant 350 g de brome par litre. On évapore à sec et chromatographie sur plaque de Silicagel G (benzène - éther de pétrole, 3 : 1 ; Rf = 0,85). On élue la bande principale, la tribromo-2,3,6 juglone au chloroforme. Rdt = 70 %. $\varepsilon^{EtOH}_{224\ nm} = 34\,000$, $\varepsilon^{EtOH}_{306\ nm} = 10\,700$, $\varepsilon^{EtOH}_{444\ nm} = 5\,250$.

HYDROLYSE ALCALINE DES PROTEINES VEGETALES OU BACTERIENNES ET ISOLEMENT DES ACIDES AMINES (41,91)

Les bactéries ou les plantes sont extraites à l'acétone. On sèche le résidu à l'étuve à 80° C pendant 2 heures puis on le broie dans un mortier.

100 mg de poudre de plantes ou 30 mg de poudre de bactéries sont traités par 12 ml de baryte à 150 g/l. On scelle sous vide après avoir dégazé la suspension puis on laisse 48 heures à 110° C. Le tube est cassé et le baryum précipité par 1 g de carboglace. On filtre sur buchner et lave avec 3 fois 5 ml d'eau.

La solution acidifiée à pH 2,2 est mise sur une colonne de Dowex 50 X (forme H^+ 30 mesh, 1 x 15 cm). On lave par 75 ml d'eau puis élue par 200 ml de NH_4OH 1 N. Les acides aminés sortent entre 20 et 60 ml. On évapore à sec et chromatographie sur deux feuilles de papier Whatman n° 3 dans l'isopr OH - NH_4OH - H_2O, 8 : 1 : 1. On révèle une fraction du chromatogramme à la ninhydrine. Rf tyrosine = 0,33, phénylalanine = 0,56, tryptophane = 0,42, leucine = 0,62. Les différentes bandes sont éluées par NH_4OH 0,5 N et les éluats évaporés à sec.

Le résidu obtenu est dissous dans 1 ml de Na_2CO_3 5 % et traité par 0,2 ml d'une solution acétonique à 50 mg/ml de dinitrofluorobenzène, sous agitation violente pendant 3 heures. On extrait l'excès de réactif à l'éther, puis on acidifie par HCl concentré et extrait les dérivés à l'éther. Ces dérivés sont purifiés par chromatographie sur Silicagel G dans trois solvants différents, par comparaison avec des témoins synthétiques cristallisés, et élués par le méthanol. Dosage par spectrométrie dans du bicarbonate 1 %.

.../...

DNP Leu et DNP Phe :

1°) Benzène - pyridine - AcOH 70 : 24 : 6
2°) $CHCl_3$ - PrOH - AcOH 80 : 20 : 2
3°) $CHCl_3$ - MeOH - AcOH 70 : 30 : 2

diDNP Tyr et DNP Try :

1°) Benzène - pyridine - AcOH 70 : 15 : 15
2°) $CHCl_3$ - PrOH - AcOH 80 : 20 : 2
3°) $CHCl_3$ - PrOH - AcOH 50 : 50 : 2

DNP Leu $\varepsilon_{360}^{NaHCO_3\ 1\ \%} = 18\,000$; DNP Try $\varepsilon_{363}^{NaHCO_3\ 1\ \%} = 16\,100$

DNP Phe $\varepsilon_{360}^{NaHCO_3\ 1\ \%} = 16\,300$; diDNP Tyr $\varepsilon_{361}^{NaHCO_3\ 1\ \%} = 16\,900$

DEGRADATION ASYMETRIQUE DE LA LAWSONE

a) Acide phtalimidèneacétique (72)

A 366 mg de lawsone recristallisée en solution dans 2,5 ml d'H_2SO_4 (d = 1,89), on ajoute, en 5 mn sous agitation à 0° C, 273 mg d'azoture de sodium. On laisse 15 mn à 0° C puis 3 h à 20° C. On ajoute 13 ml d'eau, filtre sur buchner, lave par trois fois 2 ml d'eau, essore et sèche sous vide. Rdt = 186 mg. F # 200° C.

On prélève 10 mg qu'on méthyle par du diazométhane dans l'éther jusqu'à dissolution complète, et purifie sur Silicagel G (benzène - EtMeCO, 8 : 2 ; Rf = 0,5). L'ester obtenu est dosé par spectrométrie U.V. $\varepsilon^{MeOH}_{276,5} = 16\,600$; F = 124° C

b) Décarboxylation en hydroxy-3 méthyl-3 phtalide (79) (Ac.acétophénone carboxylique).

170 mg d'acide phtalimidèneacétique dans 8 ml NaOH 2,5 N décarbonatés sont mis à reflux 1 h 45 sous un courant d'azote. Le CO_2 est recueilli dans un barboteur contenant 4 ml de NaOH décarbonatée (au bout de 1 h 30 environ, le dégagement d'ammoniac cesse). On laisse refroidir et ajoute lentement à l'aide d'une seringue, 4 ml de H_2SO_4 20 %. On laisse agir 5 mn puis met à reflux 20 mn.

La soude du barboteur est versée sur 4 ml de $BaCl_2$ 10 %. Le $BaCO_3$ obtenu est lavé et compté comme décrit précédemment. Rdt = 85 %.

L'hydroxyméthylphtalide est extrait par l'acétate d'éthyle. Rdt brut = 70 %. Après cristallisation dans 5 ml d'eau en présence de Norit, F = 115,5° C. Rdt = 112 mg (65 %).

.../...

c) Acide N-acétylanthranilique

Dans un tube à hémolyse, on dissout sous agitation magnétique à 0° C, 66 mg d'hydroxyméthylphtalide dans 0,2 ml d'H_2SO_4. On ajoute 1 ml de $CHCl_3$ et, en 5 mn, 24 mg de NaN_3. On laisse 25 mn à 0° C puis 3 h à 20° C. On dilue par 3 ml d'eau, extrait par l'acétate d'éthyle et sèche sur sulfate. Le produit obtenu est à peine coloré et donne une seule tache après chromatographie sur plaque. On cristallise dans l'acide acétique (1 ml) (5 ml) et lave par centrifugation avec 2 x 3 ml d'eau glacée et sèche. F = 185° C. Rdt = 39 mg (55 %).

d) Hydrolyse de l'acide N-acétyl anthranilique en acides acétique et anthranilique

31,2 mg d'acide N-acétylanthranilique dissous dans 20 ml d'H_2SO_4 5 % sont introduits dans un appareil de Kuhn Roth. On porte à 130° C et distille en maintenant le volume constant par addition d'eau. Après distillation de 70 ml de liquide qu'on neutralise au fur et à mesure à la microburette par NaOH 1 N, la réaction est terminée. Rdt acide acétique = 93 %.

La solution acide est neutralisée par 3 ml NH_4OH à pH 4,5 et extraite par l'AcOEt. On sèche sur sulfate et évapore à sec. Rdt = 23 mg d'acide anthranilique pur (93 %). Après chromatographie sur plaque de Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH ; 90 : 25 : 4 ; Rf # 0,35), élution par l'AcOEt et sublimation (110° C ; 0,1 mm), F = 145° C ; Rdt = 17 mg.

e) Iodoforme et acide phtalique

30 mg d'hydroxyméthylphtalique sont traités à 0° C dans un tube à centrifuger par 2 ml de NaOH 10 % puis 2,5 ml d'une solution d'iode - iodure de potassium (12,7 % I_2 + 16 % KI). Il se forme

immédiatement un précipité jaune. On laisse agiter 15 mn puis on centrifuge. On rince par 5 ml d'eau et on recristallise l'iodoforme dans 2 ml de méthanol : Rdt = 55 mg (75 %). F = 119° C. Les surnageants aqueux réunis sont acidifiés à pH 2 par HCl concentré, décolorés par du métabisulfite et extraits par l'AcOEt cinq fois. On sèche sur sulfate, évapore à sec, lave le résidu par 2 ml de chloroforme et décante. Les cristaux d'acide phtalique sont sublimés (150° C ; 0,1 mm). Rdt = 25 mg (80 %).

DEGRADATION ASYMETRIQUE DES MENAQUINONES

a) Transformation des ménaquinones en phtiocol

30 µmoles de ménaquinone dans 2 ml d'acétone et 2 ml d'éthanol absolu sont traitées à 70° C par 50 µl de Na_2CO_3 5 % et 3 x 50 µl d'eau oxygénée 30 % jusqu'à décoloration complète (10 mn).

On évapore à sec, reprend par 4 ml d'eau et extrait à l'éther. On sèche sur sulfate, évapore à sec et transfère dans un tube pyrex de 15 ml à l'aide de 4 x 0,5 ml de dioxane. On ajoute 0,5 ml de méthanol et 0,2 ml de potasse 85 %. On scelle le tube sous vide et laisse à 93° C pendant 18 heures.

On casse le tube, acidifie par un volume d'HCl 2 N et dilue par 4 volumes d'eau. On extrait à l'éther qu'on réextrait par du carbonate 5 % qui, acidifié, est réextrait par l'éther. Le produit séché est du phtiocol pratiquement pur. On recristallise (éventuellement avec du phtiocol, entraîneur) dans le méthanol aqueux. F = 173° C. On dose par spectrométrie U.V. $\varepsilon^{MeOH\,acidifié}_{251} = 19\,700$
On peut aussi chromatographier sur plaque de Silicagel G (benzène - dioxane - AcOH, 90 : 25 : 4 ; Rf = 0,7).

b) Transformation du phtiocol en lawsone par la réaction de Hoocker (54)

100 mg de phtiocol dans 10 ml de soude 0,5 % sont traités en une fois à 0° C par 120 mg de permanganate de potassium dans 10 ml de soude 10 %. On laisse agir 15 mn à 0° C et abandonne 24 h à 20° C. Le surnageant d'abord jaune-pâle se recolore en carmin au bout de 2 ou 3 heures. On filtre le bioxyde de manganèse sur buchner (filtre de fibre de verre), lave à l'eau et

.../...

acidifie le filtrat. On refroidit à 0° C et obtient des cristaux jaunes de lawsone. F = 195° C. On recristallise dans l'éthanol aqueux. Rdt = 45-50 %.

c) Dégradation du phtiocol par l'eau oxygénée

Dans un appareil de Kuhn Roth, on dissout 40 mg de phtiocol dans 4 ml NaOH 0,5 N. On porte à 100° C et ajoute 0,5 ml puis 0,2 ml H_2O_2 30 %. Après décoloration, on acidifie par 5 ml H_2SO_4 0,5 N et dilue à 15-20 ml. Le CO_2 est recueilli dans un piège à NaOH décarbonatée. On abaisse ensuite le réfrigérant et distille l'acide acétique formé en maintenant constant le volume de liquide dans le ballon. On neutralise au fur et à mesure l'acide acétique distillé par de la soude 1 N à l'aide d'une microburette. L'acide phtalique est extrait par AcOEt, purifié sur plaque de cellulose et sublimé (cf lawsone p. 140).

DEGRADATION ASYMETRIQUE DES DIMETHOXY ANTHRAQUINONES

Réactif de HODGE et DAVIS (24)

10 ml de diméthoxy-1,2 éthane (FLUKA) sont séchés et distillés sur $LiAlH_4$ (E = 85° C). On fait une solution saturée de tertiobutylate de potassium (FLUKA) dans ce solvant et dose le surnageant par l'HCl 1 N (la solution saturée est à peu près 1 N). A 1 ml de cette solution, on ajoute sous agitation 100 µl d'une solution à 5 % d'eau dans le diméthoxyéthane et le réactif ainsi obtenu est utilisé immédiatement.

Dégradation de la diméthoxy-1,2 anthraquinone (25)

16 mg de quinone (60 µmoles) sont traités par 1,2 ml de réactif de HODGE et DAVIS (60 x 20 # 1,2 mmole KOtBu) à l'abri de l'humidité, à 90° C, pendant 2 h 30. On évapore à sec, reprend dans 1 ml de KCl saturé, extrait par l'éther puis acidifie par 0,1 ml d'HCl concentré et extrait par l'AcOEt. Les acides obtenus sont chromatographiés sur plaque de Silicagel G (benzène - EtMeCO - AcOH, 80 : 20 : 1 ; Acide benzoïque Rf = 0,4 - Acide vératrique Rf = 0,3), élués à l'AcOEt puis rechromatographiés sur plaque de cellulose (Isopr OH - NH_4OH - H_2O, 8 : 1 : 1 ; Acide benzoïque Rf = 0,75 ; Acide vératrique Rf = 0,6) et dosés par spectrométrie U.V. : acide benzoïque $\varepsilon^{MeOH}_{273} = 885$ - acide vératrique $\varepsilon^{MeOH}_{260} = 11\,800$

Dégradation de la diméthoxy-1,3 anthraquinone (25)

23 µmoles de quinone sont traités de la même manière que précédemment par 0,5 ml de réactif de HODGE et DAVIS. Les acides obtenus sont chromatographiés sur Silicagel G (benzène - EtMeCO - AcOH, 80 : 20 : 1, acide diméthoxy-3,5 benzoïque Rf = 0,35), élués par l'AcOEt et MeOH puis rechromatographiés individuellement sur Silicagel G (hexane - éther - AcOH, 75 : 45 : 1, Ac.benzoïque Rf = 0,4 Ac.diméthoxy-3,5 benzoïque Rf = 0,25). On dose par spectrométrie U.V. Ac.diméthoxy-3,5 benzoïque $\varepsilon^{MeOH\ acidifié}_{251\ nm} = 5\,840$ $\varepsilon^{MeOH\ acidifié}_{305\ nm} = 3\,060$.

ECHANGE DE PROTONS DES QUINONES ET HYDROQUINONES EN MILIEU AQUEUX

Lawsone :

Echange avec l'eau tritiée :

20 mg de lawsone sont dissous dans 10 ml de bicarbonate 5 % + 10 µl T_2O (activité spécifique finale = 20 100 dpm/µproton). Après acidification, on extrait par l'acétate d'éthyle, lave à l'eau et sèche sur sulfate. Puis on reprend au méthanol et évapore à sec trois fois. On dose par spectrométrie U.V. Act. spéc. = 17 900 dpm/µmole. Il y a donc incorporation de 0,9 proton par mole de lawsone.

Echange lors de la transformation en triacétate :

20 mg de lawsone dans 1 ml d'anhydride acétique (contenant environ 3 % d'eau) + 10 µl T_2O ($2,2.\ 10^{10}$ dpm total) sont traités comme décrit précédemment.

Après deux recristallisations dans le méthanol, on obtient 15,8 mg de triacétate. Act. spéc. = $4,52\ \ 10^6$ dpm/µmole.

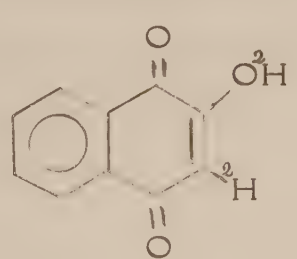
L'eau dans le milieu a une activité spécifique d'environ

$$\frac{2,2\ \ 10^{10} \times 9\ \ 10^{-3}}{30 + 10} = 5\ 10^6 \text{ dpm/µproton}.$$

Ainsi, l'échange correspond à l'incorporation d'environ 0,9 proton par mole de triacétate.

Spectre de Masse

Le spectre de masse effectué en présence d'eau deutérée donne un pic de masse à M + 2



.../...

Echange Juglone-^{3}HOH

Cet échange a été étudié dans la gamme de pH 2,4 à 11,5 à l'aide du tampon universel de BRITTON-WELFORD.

On met en solution 40 mg de juglone dans 5 ml de dioxane. Chaque essai contient 0,5 ml de tampon, 0,5 ml de solution de juglone et 10 µl T_2O.

En milieu alcalin, la juglone se détruit et ne permet pas la mesure de l'échange. Après 18 heures d'échange en milieu acide ou neutre, l'incorporation est inférieure à 0,01 proton/mole (voir figure 2 p.72).

Le tampon contient 100 ml de mélange à 0,02857 M de véronal, d'acide citrique, d'acide borique et de phosphate monopotassique de pH 2,42 et de 0 à 100 ml d'une solution de soude 0,2 N.

Echange naphtoquinone - T_2O

La naphtoquinone a été considérée comme un précurseur de la lawsone et de la juglone. Traitée de la même façon que la juglone dans le tampon universel en présence d'eau tritiée, à pH > 7, la naphtoquinone est rapidement détruite et donne un produit de spectre U.V. différent ($\lambda_{max}^{cyclohexane}$ = 228 et 280 nm). A pH < 7 l'échange après 18 heures ne dépasse pas 0,015 % (voir figure 2 p. 72).

Echange naphtohydroquinone - T_2O

La naphtohydroquinone oxydée en quinone par le sel de Fremy en présence d'eau tritiée, n'incorpore pas de tritium. C'est pourquoi, il est possible de mesurer l'échange de tritium de la naphtoquinone avec l'eau tritiée en l'oxydant en quinone et en purifiant celle-ci sur plaque. Si l'on utilise de la naphtohydroquinone ^{14}C, la mesure du rapport tritium / carbone dans la quinone purifiée permet de calculer aisément l'incorporation du tritium.

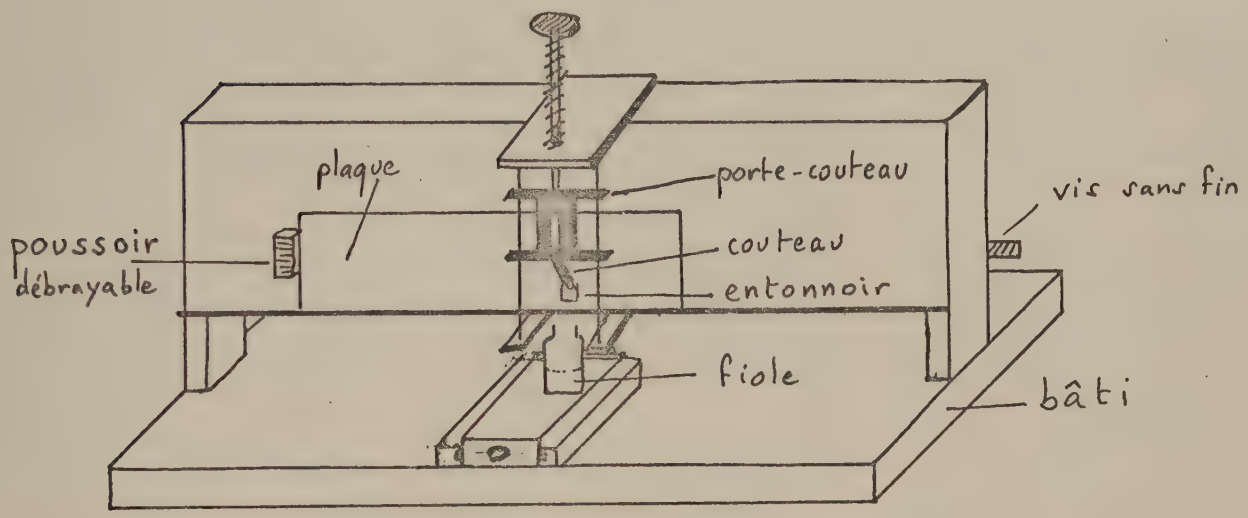
.../...

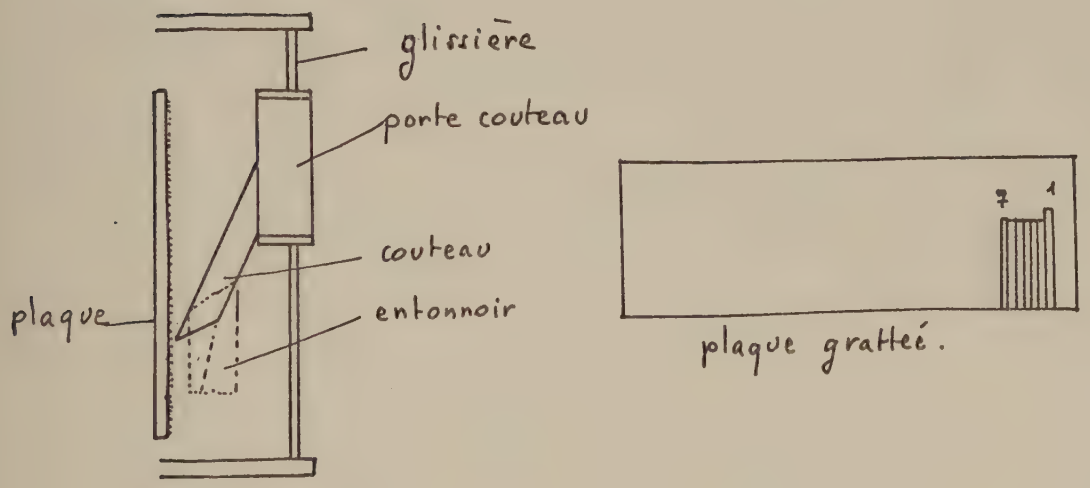
20 mg de naphtohydroquinone ^{14}C (^{14}C-1,4,5,8 act. spéc. = 27 000 dpm/µmole) sont mis en solution dans 2 ml de dioxane + 100 µl T_2O.

0,2 ml de cette solution et 0,4 ml de tampon sont mis dans un tube, congelés et le tube est scellé sous vide. Après 36 heures à 37° C, le tube est ouvert. L'hydroquinone est oxydée par le sel de Fremy. La quinone est extraite à l'éther et chromatographiée sur plaque de Silicagel G (benzène, Rf = 0,4). La quinone éluée à l'éther est comptée en double marquage (figure 2 p. 72).

La même expérience a été aussi réalisée à des temps variables dans le tampon pH 8 (figure 2 p. 72). Les courbes montrent qu'à pH acide ou neutre, l'échange est lent et qu'à pH alcalin, l'échange est assez rapide : 0,8 proton échangé après 36 h à pH 8.

Cet appareil a permis par exemple à SCHERRER et AZERAD de mesurer par "chromatographie unidirectionnelle multiple" un effet isotopique entre la ménaquinone $^{14}CH_3$ et la ménaquinone CH_2-^{3}H, alors que la différence de Rf est $\leqslant 2\ \%$ (88).





Mesure de la radioactivité :

On mesure la radioactivité à l'aide d'un compteur en scintillation liquide PACKARD TRICARB 3314, équipé d'une standardisation externe. On utilise soit un coctail Toluène à 4 g/l de PPO et 0,3 g/l de diméthyl POPOP, soit de l'INSTAGEL (Packard).

BIBLIOGRAPHIE

(1) R. AZERAD, R. BLEILER-HILL, O. SAMUEL, F. CATALA, E. LEDERER
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 27 (1967) 253.

(2) R. AZERAD, R. BLEILER-HILL, E. LEDERER
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 19 (1965) 194.

(2b) BENTLEY
Molecular asymetry in biology - "Adademic Press" - Vol.II (1970) 110, 141.

(3) L.A. BIGELOW
J. Amer. Chem. Soc. - 41 (1919) 1575.

(4) A.J. BIRCH, C.J. MOYE, R.W. RICKARDS, Z. VANEK
J. Chem. Soc. - (1962) 3586.

(5) F. BOBERG, G. WINTER, J. MOSS
Ann. Chem. - 616 (1958) 17.

(6) B.A. BOHM, G.H.N. TOWERS
Canad. J. Bot. - 40 (1962) 677 - 43 (1965) 293.

(7) B.A. BOHM
Chem. Reviews - (1965) 435.

(8) J. BOUGAULT
J. Ph. et Chim. (1913) 7, 8, 295
C. R. Acad. Sci. - 157 (1913) 403.

(9) J.H. BOYER, D. STRAW
J. Am. Chem. Soc. - 75 (1953) 2683.

(10) A.R. BURNETT, R.H. THOMSON
Chem. Com. - (1967) 1125
J. Chem. Soc. - C (1968) 2437.

(11) I.M. CAMPBELL
Tetrahedron Letters - 54 (1969) 4777.

(12) I.M. CAMPBELL, C.J. COSCIA, M. KELSEY, R. BENTLEY
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 28 (1967) 25.

(13) I.M. CAMPBELL, D.J. ROBINS, M. KESLEY, R. BENTLEY
Biochemistry - 10 (1971) 3069.

.../...

(14a) F. CATALA, R. AZERAD, E. LEDERER
J. Int. Vitaminol. - 40 (1970) 363.

(14b) D. CHEN, B.A. BOHM
Can. J. Biochem. - 44 (1966) 1389.

(15a) P. CORDIER
Bull. Soc. Chim. France - (1955) 564.

(15b) J. BOUGAULT, P. CORDIER
C. R. Acad. Sci. - (1954) 238.

(16) G.B. COX, F. GIBSON
Biochem. Biophys. Acta - 93 (1964) 204.

(17) G.B. COX, F. GIBSON
Biochem. J. - 100 (1966) 1.

(18) G.B. COX, A.M. SNOSWELL, F. GIBSON
Biochem. Biophys. Acta - 153 (1968) 1.

(19) J. DALY, D. JERINA, S. UDENFRIEND, B. WITKOK
Advances in chemistry series ACS oxydations at organic compounds - III - 77 (1968) 279.

(20) P. DANSETTE, R. AZERAD
Bull. Soc. Chim. France - (1968) 2492.

(21) P. DANSETTE, R. AZERAD
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 40 (1970) 1090.

(22) P. DANSETTE, R. AZERAD
Biochimie (à paraître).

(23) D.D. DAVIES, A. TEIXEIRA, P. KENWORTHY
Biochem. J. - 127 (1972) 335.

(24) D.G. DAVIES, M. DERENBERG, P. HODGE
J. Chem. Soc. - (C) (1971) 455.

(25) D.G. DAVIES, P. HODGE
Chem. Com. - (1968) 953 - J. Chem. Soc. (C) (1971) 3158.

(26) B.D. DAVIS
Congrès Int. Biochim. 2nd - Paris 1952 p. 32-40.

(27a) B.D. DAVIS
J. Bact. - 66 (1953) 129.

(27b) B.D. DAVIS, G. GILVARG, S. MITSUHASHI
Methods in enzymology - S.P. Colowick, N.O. Kaplan Editors - Acad. Press. New-York - Vol. II (1955) p. 301.

(28) J.M. EDWARDS, L.M. JACKMAN
Australian J. Chem. - 18 (1965) 1227.

.../...

(29) Z. EL HACHIMI
En préparation.

(29b) D.S. ERLEY, W.J. POTTS, R.R. JONES, P.J. DESIO
Chem. Ind. - (1964) 1915.

(30) S. ESKOLA
Suomen Kemistilehti - 17 B (1944) 15.

(31) L. FIESER, M. FIESER
J. Am. Chem. Soc. - 56 (1934) 1565

(32a) L. FIESER
J. Am. Chem. Soc. - 61 (1939) 3467, 3473, 2559.

(32b) L. FIESER, M. FIESER
J. Am. Chem. Soc. - 61 (1939) 2561.

(33) L. FIESER
J. Biol. Chem. - 133 (1940) 391.

(34a) L. FIESER, M. FIESER
Advances in Organic Chemistry.

(34b) SCHTSCHUKINA
Z. Obsc. Chim. - 19 (1949) 468 - C.A. (1949) 7008.

(35a) R. FITTIG
Ann. Chem. - 216 (1882) 97 - 299 (1898) 1.

(35b) R. FITTIG
Ber. Deut. Chem. Ges. - 29 (1896) 2582.

(36) H.G. FLOSS, D.K. ONDERKA, M. CARROLL
J. Biol. Chem. - 247 (1972) 736.

(37) F. GIBSON
Communication personnelle.

(38) F. GIBSON, J. PITTARD
Bact. Reviews - 32 (1968) 465.

(39) M.I. GIBSON , F. GIBSON
Biochem. J. - 90 (1964) 248.

(40) GISVOLD
J. Am. Pharm. Assoc. - 31 (1942) 202.

(41) J.P. GREENSTEIN
Chemistry of amino acid - J. Wiley and sons - New York - London
p. 1366 et 1612.

.../...

(42) R. GREWE, J.P. JESCHKE
Ber. Deut. Chem. Ges. - 89 (1956) 2080.

(43) H. GROSS, G. MATTEY
Ber. Deut. Chem. Ges. - 97 (1964) 2606

(44) E. GROTZINGER, I.M. CAMPBELL
Phytochem. - 11 (1972) 675.

(45) M. GUERIN, R. AZERAD, E. LEDERER
Bull. Soc. Chim. Biol. - 50 (1968) 187.

(46) M. GUERIN, R. AZERAD, E. LEDERER
Bull. Soc. Chim. Biol. - 47 (1965) 2105.

(47) M. GUERIN, M. LEDUC, R.G. AZERAD
Eur. J. Biochem. - 15 (1970) 421.

(48) K. HAIDER
J. of Labelled Compounds - 2 (1966) 174.

(49) L.V. HANKES, J. SUHADOLNIK
Biochem. Prep. - 11 (1966) 63.

(50) E.T. HARPER, M.L. BENDER
J. Am. Chem. Soc. - 87 (1965) 5625.

(51) E. HASLAM, R.D. HAWORTH, P.F. KNOWLES
J. Chem. Soc. - (1961) 1854.

(52) K. HEYNS, H. GOTTSCHALK
Ber. Deut. Chem. Ges. - 91 (1961) 343.

(53a) R.K. HILL, A.G. EDWARDS
Tetrahedron Letters - 44 (1969) 3239.

(53b) R.K. HILL, G.R. NEWKOME
J. Am. Chem. Soc. - 91 (1969) 5893.

(54) S. HOOKER
J. Am. Chem. Soc. - 58 (1936) 1174.

(55) A.H. HOWMEYER, V.H. WALLINGFORD
J. Am. Chem. Soc. - 64 (1942) 798.

(56) C.K. INGOLD
J. Chem. Soc. - (1931) 1959.

(57) L.M. JACKMAN, I.G. O'BRIEN, G.B. COX, F. GIBSON
Biochim. Biophys. Acta - 141 (1967) 1.

.../...

(58) M. LEDERER
Australian J. Sci. - 11 (1949) 208.

(59) M.M. LEDUC, P.M. DANSETTE, R.G. AZERAD
Eur. J. Biochem. - 15 (1970) 428.

(60) E. LEISTNER
Phytochem. - 10 (1971) 3015.

(61) E. LEISTNER
(sous presse)

(62) E. LEISTNER, M.H. ZENK
Z. Naturforsch. - 22 b (1967) 865.

(63) E. LEISTNER, M.H. ZENK
Tetrahedron Letters - (1968) 861.

(64) E. LEISTNER, M.H. ZENK
Tetrahedron Letters - (1968) 1395.

(65) E. LEISTNER, M.H. ZENK
Z. Naturforsch. - 23 b (1968) 259.

(66) E. LEISTNER, M.H. ZENK
Chem. Com. - (1969) 210.

(67) E. LEISTNER, M.H. ZENK
Tetrahedron Letters - (1971) 1677.

(68) M. LEV
J. Gen. Microbiol. - 20 (1959) 697.

(69) J.B. MAC DONALD, R.J. GIBBONS, S.S. SOCRANSKY
Ann. N.Y. Acad. Sci. - 85 (1960) 467.

(70) C. MARTIUS, W. LEUZINGER
Biochem. Z. - 340 (1964) 304.

(71) A. MEYNAUD, A. VILLE, H. PACHECO
C. R. Acad. Sci. - 266 (1968) 1783.

(72) H. W. MOORE, H.R. SHELDEN
J. Org. Chem. - 32 (1967) 3603.

(73) D.K. ONDERKA, H.G. FLOSS
J. Am. Chem. Soc. - 91 (1969) 5894.

(74) Organic Reactions
J. Wiley and sons - London 1949 - 5e édition - Vol. III, p. 307-449.

.../...

(75) Organic Syntheses
Coll. Vol. III - Wiley and sons - (1962) 174.

(76) D. RADULESCU, Gh. GHEORGIU
Ber. Deut. Chem. Ges. - 59 (1927) 186.

(77) D.J. ROBINS, R. BENTLEY
Chem. Com. - (1972) 232.

(78) D.J. ROBINS, I.M. CAMPBELL, R. BENTLEY
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 39 (1970) 1081.

(79) W. ROSER
Ber. Deut. Chem. Ges. - 17 (1884) 2623.

(80) W. ROSER
Ber. Deut. Chem. Ges. - 17 (1884) 2770 - 18 (1885) 3115.

(81) W. RUELIUS, A. GAUHE
Annalen - 571 (1951) 69.

(82) RUSSIG
J. Prakt. Chem. - 62 (1900) 33.

(83) SAKAMI
Handbook of Isotope Tracer Methods. (Department of Biochemistry - Western Reserve University, School of Medecine, Cleveland, Ohio - 1955.

(84) I.I. SALAMON, B.D. DAVIS
J. Am. Chem. Soc. - 75 (1953) 5567.

(85) W. SANDERMAN, H.H. DIETRICHS
Holz. Roh. Werkst. - 15 (1957) 281.

(86) K.H. SCHARF, M.H. ZENK, D.K. ONDERKA, M. CAROLL, H.G. FLOSS.
Chem. Com. - (1971) 576.

(87) K.H. SCHARF, M.H. ZENK, D.K. ONDERKA, M. CAROLL, H.G. FLOSS
Chem. Com. - (1971) 765.

(88) F. SCHERRER, R. AZERAD
Experientia - 26 (1970) 1201.

(89) S. SENOH, T. SAKAN
J. Chem. Japan - 75 (1954) 927.

.../...

(90) F. SNYDER
Anal. Biochem. - 9 (1964) 183.

(91) E. STAHL
Thin Layer Chomatography "Springer Verlag" Berlin, Heidelberg New-York, Academic Press Inc. (New York - London) - (1965) p.414.

(92) R.H. THOMSON
J. Org. Chem. - (1948) 377.

(93) R.H. THOMSON
J. Chem. Soc. - (1950) 1737.

(94) R.H. THOMSON
"Naturally occuring quinones" - 2e édition (1971) - Academic Press London - New-York.

(95) A.I. VOGEL
A textbook of practical organic chemistry - Third Edition 1962 Longmans p. 590, 599, 607.

(96) H. WEIGEL
"Advances in Carbohydrate Biochem.". Academic Press - New-York London. - Vol. 18 (1963) 65.

(97) I.G. YOUNG, T. BATTERHAM, F. GIBSON
Biochem. Biophys. Acta - 165 (1968) 567, - 177 (1969) 348.

(98) I.G. YOUNG, F. GIBSON, C.G. MACDONALD
Biochem. Biophys. Acta - 192 (1969) 62.

(99) M.H. ZENK, E. LEISTNER
Z. Naturforsch. - 22 b (1967) 460.

(100) M.H. ZENK, E. LEISTNER
Biosynthesis of quinones - Lloydia - 31 (1968) 275.

-:-:-:-:-